

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CAMILA DE ALBUQUERQUE MERCALI

**ESTUDO DO PERFIL FITOQUÍMICO, NUTRICIONAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO BROTO DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.)**

CURITIBA
2011

CAMILA DE ALBUQUERQUE MERCALI

**ESTUDO DO PERFIL FITOQUÍMICO, NUTRICIONAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DO BROTO DE GIRASSOL (*Helianthus annuus* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: *Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel*
Co-Orientadora: *Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel*

CURITIBA
2011

Mercali, Camila de Albuquerque

Estudo do perfil fitoquímico, nutricional e atividades biológicas do broto de girassol (*Helianthus annuus L*) / Camila de Albuquerque Mercali – Curitiba: UFPR, 2011.

107 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Obdulio Gomes Miguel

Corientadora: Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná

Inclui bibliografia

1. *Helianthus annuus L*. 2. Alelopatia. 3. Atividade antioxidante. 4. Toxicidade. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdulio Gomes. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

*“Você agora está limitado;
quando, porém, pela meditação diária e profunda,
puder transferir sua consciência do finito para o infinito, será livre.
Você não se destina a ser prisioneiro do corpo.
Você é filho de Deus e deve viver à altura dessa herança divina”*

(Paramahansa Yogananda)

AGRADECIMENTOS

O agradecimento é um sentimento que nos eleva, que é capaz de nos transformar, de nos levar para esferas mais elevadas de vibração.

*Primeiramente agradeço à **Deus**, meu pai divino que me deu a vida e as dádivas que recebo todos os dias.*

*Agradeço aos **seres de luz** que me acompanharam e me guiaram durante toda a realização deste trabalho.*

E a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma, pois não conquistamos nada na vida sozinhos, um simples gesto pode mudar o curso de nossas vidas e contribuir para o nosso sucesso.

*Aos meus pais **Indianara** e **Protásio** que me trouxeram à vida, investiram em minha formação, sempre acreditaram em mim e me apoiaram. E aos meus irmãos **Bruno** e **Gabriela** pela companhia.*

*À **Universidade Federal do Paraná** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** pela confiança, dedicação, amizade e principalmente paciência.*

*À minha co-orientadora **Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel** por acreditar em mim e me incentivar desde o início.*

*À **Prof^a Dr^a Ana Luísa Lacava Lordello**, do Departamento de Química da UFPR, pela contribuição, dedicação, alto astral, boa vontade e paciência na análise do espectro de RMN e sugestão de referências.*

*À **Embrapa** soja, especialmente à **Maria Regina Villas Boas** por fornecer as sementes de girassol.*

*Ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal do Paraná e a **Prof^a Dr^a Lys Mary Bileski Candido** pela possibilidade de realizar as análises nutricionais.*

Ao técnico **Jair**, do Laboratório de Análise de Alimentos, por seu auxílio e dedicação na realização das análises.

À minha querida companheira de laboratório **Beatriz**, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou muito desde o início até o fim do mestrado, por sua amizade e dedicação comigo.

Às colegas de mestrado **Patrícia**, **Fernanda C.**, **Fernanda S.**, pela amizade, disposição em sempre ajudar e por todos os momentos que compartilhamos juntas. E aos colegas de mestrado **Carlos**, **Vinícius** e **Vanessa** pela disposição e contribuição.

Às doutorandas **Josiane**, **Mayumi**, **Maria Cristina**, **Cristiane Bezerra**, **Milena** e **Cristina Peitz** pelo apoio, companheirismo, pelos ensaios que só foram possíveis de realizar com a ajuda de cada uma, amizade e carinho.

Aos estagiários **Adri**, **Suellen** e **Fernando** do Laboratório de Farmacotécnica pelo auxílio na realização de alguns ensaios.

À equipe do **Professor Miguel**, principalmente a **Patrícia Mazureki** pela realização do ensaio da tirosinase.

À minha querida amiga e companheira **Thai**, por todo o incentivo, companheirismo e por nossa eterna amizade.

À **Gesoeli**, **Karen**, **Camila** e **Thiago** que trabalham comigo e me apoiaram na realização deste trabalho.

Ao **Fernando Esteban** pelo companheirismo, apoio, correção e sugestões para a dissertação.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	10
	LISTA DE GRÁFICOS	12
	LISTA DE TABELAS	13
	LISTA DE QUADROS	14
	LISTA DE SIGLAS	15
	LISTA DE SÍMBOLOS	16
	RESUMO	18
	ABSTRACT	19
1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1	ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS.....	23
3.1.1	Consumo de Brotos	23
3.2	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Helianthus annuus</i> L.....	24
3.2.1	Família Asteraceae.....	25
3.2.2	Gênero <i>Helianthus</i>	25
3.2.3	A espécie <i>Helianthus annuus</i> L	26
3.3	CULTIVO DO GIRASSOL NO BRASIL	27
3.4	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	29
3.4.1	Atividade Alelopática	29
3.4.2	Atividade Antioxidante	31
3.4.3	Atividade Microbiológica	32

3.5	COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	32
3.5.1	Terpenoides.....	32
3.5.2	Flavonoides	36
3.5.3	Cumarinas	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	39
4.1.1	Determinação de Umidade	39
4.1.2	Determinação de Cinzas Totais.....	39
4.1.3	Determinação do Teor de Lipídeos Totais.....	40
4.1.4	Determinação de Proteína Bruta	40
4.1.5	Determinação de Açúcares Totais.....	41
4.1.6	Determinação de Fibras Totais.....	41
4.1.7	Determinação de Vitamina C	42
4.2	FLUXOGRAMA DO ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	43
4.3	ESTUDOS FITOQUÍMICOS	43
4.3.1	Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica	44
4.3.1.1	Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%	44
4.3.1.2	Preparo do extrato aquoso a 20%	45
4.3.1.3	Pesquisa de alcaloides	45
4.3.1.4	Pesquisa de ácidos orgânicos	45
4.3.1.5	Pesquisa de fenóis	46
4.3.1.6	Pesquisa de flavonoides.....	46
4.3.1.7	Pesquisa de cumarinas	46
4.3.1.8	Pesquisa de antraquinonas	47
4.3.1.9	Pesquisa de esteróis e triterpenos.....	47
4.3.1.10	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	47

4.3.1.11 Pesquisa de heterosídeos saponínicos	48
4.3.1.12 Pesquisa de heterosídeos ciagenéticos	48
4.3.1.13 Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens	48
4.3.1.14 Pesquisa de taninos	48
4.3.1.15 Pesquisa de aminogrupos	49
4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	49
4.4.1 Determinação do Teor de Sólidos e Cor.....	49
4.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	50
4.6 CROMATOGRAFIA GASOSA DA FRAÇÃO HEXANO	50
4.7 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS.....	51
4.7.1 Cromatografia líquida em coluna	51
4.8 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS.....	51
4.9 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	52
4.9.1 Preparo das Amostras	52
4.9.2 Preparo do Material	53
4.9.3 Teste de Germinação	53
4.9.4 Teste de Crescimento.....	54
4.9.5 Índice Mitótico.....	54
4.9.6 Preparo do Material Vegetal para Testes de Atividade Enzimática	55
4.9.7 Proteínas Totais.....	55
4.9.8 Atividade da Superóxido Dismutase	56
4.9.9 Atividade da Peroxidase	56
4.9.10 Atividade da Catalase	56
4.9.11 Atividade da Polifenoloxidase	57
4.9.12 Atividade de α -amilase	57
4.9.13 Teor de Clorofila e Respiração	58
4.9.14 Análise Estatística	58

4.10	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	59
4.10.1	Formação do Complexo Fosfomolibdênico	59
4.10.2	Redução do Radical DPPH	62
4.11	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	61
4.11.1	Preparo da Solução Salina	61
4.11.2	Eclosão dos Ovos.....	62
4.11.3	Preparo das Amostras	62
4.11.4	Avaliação da Toxicidade.....	63
4.12	ATIVIDADE HEMOLÍTICA.....	63
4.13	ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE.....	64
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	65
5.2	ESTUDOS FITOQUÍMICOS	66
5.2.1	Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica	66
5.2.2	Preparo do Extrato e das Frações Hexano, Acetato de Etila, Clorofórmio e Hidroalcoólica Remanescente.....	67
5.2.3	Determinação de Ácidos Graxos da Fração Hexano.....	68
5.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	70
5.3.1	Identificação da Substância AC1	70
5.4	DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU.....	75
5.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	77
5.5.1	Atividade Alelopática	77
5.5.1.1	Avaliação da germinação	77
5.5.1.2	Avaliação do crescimento.....	78
5.5.1.3	Análise do índice mitótico	81
5.5.1.4	Análise da atividade da peroxidase, catalase, superóxido dismutase, polifenoloxidase, α -amilase e proteínas totais.....	83

5.5.1.5	Análise do teor de clorofila e respiração.....	87
5.5.2	Atividade Antioxidante	88
5.5.2.1	Ensaio pelo Método da Redução do Complexo do Fosfomolibdênio	88
5.5.2.2	Ensaio qualitativo pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).....	90
5.5.2.3	Ensaio quantitativo pela Redução do Radical DPPH.....	90
5.5.3	Avaliação da Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i>	94
5.5.4	Atividade Hemolítica	95
5.5.5	Atividade da Enzima Tirosinase	96
6	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação do Composto Sulforafano	24
Figura 2	– Mapa de Localização da Espécie <i>Helianthus annuus</i> L.....	27
Figura 3	– [A] – Broto de Girassol. [B] - Girassol.....	28
Figura 4	– Representação do Composto Sundiversifolida	30
Figura 5	– Representação do Composto Helivypode G	31
Figura 6	– Representação do Composto Isopreno.....	33
Figura 7	– Estruturas de Sesquiterpenoides Isolados de <i>Helianthus annuus</i> L	34
Figura 8	– Estruturas de Lactonas Sesquiterpenicas Isoladas de <i>Helianthus annuus</i> L.....	35
Figura 9	– Estrutura de Diterpenoides Isolados de <i>Helianthus annuus</i> L.....	35
Figura 10	– Estrutura do Diterpenoide Helikauranoside A	36
Figura 11	– Flavonóides de <i>H annuus</i> L.....	37
Figura 12	– Estrutura das Cumarinas Escopoletina e Hiapina	38
Figura 13	– Cromatograma da Fração Hexano.....	69
Figura 14	– Espectro no Infravermelho da Substância AC1	71
Figura 15	– Espectro de RMN de ^{13}C de AC1 (50MHz, DMSO- d_6)	73
Figura 16	- Espectro de DEPT 1350 da Substância AC1 (50MHz, DMSO- d_6) ..	73
Figura 17	– Espectro de RMN de ^1H da Substância AC1 (200 MHz, DMSO- d_6)	74
Figura 18	– Estrutura Química do 1,4 Diacetato de Fenila.....	74
Figura 19	– Estrutura Química do Dimetil Tereftalato	75
Figura 20	– Índice Mitótico em Células Meristemáticas de raízes de Plântulas de Alface, Expostas a Diferentes Concentrações do extrato Bruto, das Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle	81

Figura 21 – Atividade da Peroxidase e Superóxido Dismutase, em Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle	83
Figura 22 – Atividade da Catalase, Polifenoloxidase em Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle	84
Figura 23 – Atividade da α -amilase e Proteínas Totais, em Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle	86
Figura 24 – Teor de Clorofila e Respiração em Raízes de Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle	87
Figura 25 – Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH.....	90
Figura 26 – Ausência do Halo de Hemólise, Presença do Halo Escuro ao Redor das Amostras	96

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva Padrão de Ácido Gálico e Equação da Curva	76
Gráfico 2 – Médias de Germinação de Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	78
Gráfico 3 – Porcentagem de Crescimento da Radícula de Sementes <i>Lactuca sativa</i>	80
Gráfico 4 – Porcentagem de Inibição do Complexo Fosomolibdênio em relação aos controles Vitamina C e Rutina	89
Gráfico 5 – Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH	91
Gráfico 6 – Curva da Rutina pela Redução do DPPH	91
Gráfico 7 – Curva da Fração Acetato de Etila pela Redução do DPPH.....	92
Gráfico 8 – Curva do Extrato Bruto pela Redução do DPPH	92
Gráfico 9 – Curva da Fração Clorofórmio pela Redução do DPPH	93
Gráfico 10 – Atividade do Extrato Bruto Sobre a Enzima Tirosinase	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição Físico-Química em Porcentagem do Broto de Girassol	65
Tabela 2 – Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica de <i>Helianthus annuus</i> L	67
Tabela 3 – Resultados Obtidos com o Extrato Bruto	68
Tabela 4 – Resíduo Seco das Frações do Extrato Bruto de <i>Helianthus annuus</i> L	68
Tabela 5 – Relação da Composição de Ácidos Graxos Obtidos na Análise Cromatográfica da Fração Hexano do Broto de Girassol.....	70
Tabela 6 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ¹³ C e RMN- ¹ H da Substância AC1	72
Tabela 7 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ¹³ C e RMN- ¹ H da Substância AC1	75
Tabela 8 – Absorbância e Concentração de Polifenóis Correspondente à Ácido Gálico	76
Tabela 9 – Teste de Scott-Knott para o Índice de Velocidade de Germinação das Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	77
Tabela 10 - Teste de Scott-Knott para a Avaliação do Crescimento da radícula e Hipocórito das Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	79
Tabela 11 - Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo Fosfomolibdênio.....	88
Tabela 12 – Resultado de IC ₅₀ e Teste de Tukey para Redução do DPPH	93
Tabela 13 – Mortalidade de <i>Artemia salina</i> e Estimativa de DL ₅₀	95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Enquadramento Taxonômico do <i>Helianthus annuus</i> L.....	24
Quadro 2 – Cálculo da Atividade Antioxidante Relativa pelo Método Fosfomolibdênio	60
Quadro 3 – Cálculo da Atividade Antioxidante Relativa pelo Método DPPH	61

LISTA DE SIGLAS

AA	– Atividade Antioxidante
Abs	– Absorbância
AOAC	– Association of Official Analytical Chemists
CAT	– Catalase
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CG	– Cromatografia Gasosa
COX-2	– Ciclooxigenase - 2
DCNT	– Doenças Crônicas não Transmissíveis
DMSO	– Dimetilsulfóxido
DNA	– Ácido Desoxirribonucleico
EB	– Extrato Bruto
EDTA	– Etilenoaminotetracetato Tetrasódico
et al.	– E Colaboradores
FA	– Fração Acetato de Etila
FC	– Fração Clorofórmio
FH	– Fração Hexano
FHA	– Fração Hidroalcoólica
HCL	– Ácido Clorídrico
IAL	– Instituto Adolfo Lutz
IV	– Infravermelho
IVG	– Índice de Velocidade de Germinação
L-DOPA	– Levodopa
MHz	– Megahertz
NOS-2	– Óxido Nítrico Sintetase – 2
POD	– Peroxidase
POL	– Polifenol oxidase
RMN- ¹³ C	– Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN- ¹ H	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	– Singleto
SOD	– Superóxido dismutase
UAE	– Unidade de Atividade Enzimática
UV	– Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	– Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	– Micrograma por mililitro
μL	– Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	– Graus Celsius
C	– Carbono
CH	– Grupo Metínico
CH_2	– Grupo Metileno
CH_3	– Grupo Metil
C-O	– Carbonila
DL_{50}	– Dose letal média
DPPH	– 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
Hz	– Hertz
IC_{50}	– Concentração inibitória média
M	– Molar
mDO	– Mili Densidade Óptica
mg	– Miligramas
mg	– Miligramas
mg/mL	– Miligrama por mililitro
mL	– Mililitro
mm	– Milímetros
mm^2	– Milímetros quadrados
N	– Normal
Na_2SO_4	– Sulfato de sódio
NaCl	– Cloreto de Sódio
NaOH	– Hidróxido de Sódio
NH_4OH	– Hidróxido de amônio
nm	– Nanômetro
pH	– Potencial hidrogeniônico
ppm	– Parte por milhão
TNF- α	– Fator de Necrose Tumoral – alfa
TTC	– Cloridrato de Trifenil Tetrazólio

USDA	– United States Department of Agriculture
v/v	– Volume/volume
W	– Watts
>	– Maior que
<	– Menor que
%	– Por cento

RESUMO

Os brotos são alimentos consumidos no mundo todo, são saudáveis e proporcionam uma maior variedade de alimentos para o consumo diário. O girassol é cultivado especialmente para produção do óleo e, recentemente, o broto de girassol passou a ser consumido por um grupo específico de pessoas, principalmente os vegetarianos. Este trabalho teve como objetivo estudar o perfil fitoquímico, nutricional e atividades biológicas do broto de girassol. Preparou-se o extrato etanólico o qual foi submetido ao particionamento com os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila. Foi realizada a cromatografia gasosa da fração hexano e esta apresentou maior quantidade de ácidos graxos insaturados, com destaque para o ácido linoléico. A partir da fração acetato de etila obteve-se um composto por meio de coluna cromatográfica líquida, o qual foi identificado por espectroscopia de infravermelho, RMN ^{13}C e RMN ^1H , denominado como 1,4 diacetato de fenila, composto reportado pela primeira vez no girassol. No estudo da atividade alelopática a fração clorofórmio inibiu e a acetato de etila estimulou o crescimento da radícula de *Lactuca sativa*, além de todas as amostras inibirem a divisão celular, estimularem a atividade de algumas enzimas antioxidantes e inibirem a atividade respiratória e o teor de clorofila da mesma planta. O extrato bruto, a fração clorofórmio e acetato de etila revelaram grande capacidade antioxidante pelos métodos da redução do complexo do fosfomolibdênio e pela redução do radical DPPH, resultado que pode estar associado à alta concentração de polifenóis totais presentes nas mesmas. O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* demonstrou que apenas a fração hexano e hidroalcoólica não apresentaram toxicidade. Já para o ensaio de hemólise as amostras não demonstraram atividade. O extrato bruto não apresentou atividade sobre a enzima tirosinase. A avaliação nutricional demonstrou que o broto possui alto teor de água e proteína, e baixo teor de gordura, fibras e vitamina C.

Palavras chave: *Helianthus annuus* L., asteraceae, atividade alelopática, atividade antioxidante, toxicidade, avaliação nutricional.

ABSTRACT

The seedlings are consumed worldwide, they are healthy and provide greater variety of foods for daily consumption. Sunflower is grown specifically for oil production and, recently, sunflower seedlings have started being consumed by a specific group of people, especially vegetarians. This work had as a goal the study of the sunflower seedling phytochemistry, nutrition content and biological activities. The ethanolic extract was prepared, and it was partitionated with the solvents hexane, chloroform and ethyl acetate. The gas chromatography of hexane fraction was done and it demonstrated higher amounts of unsaturated fatty acids, mainly linoleic acid. From the ethyl acetate fraction it was obtained a compound by liquid chromatography column. It was identified with infrared spectroscopy, ^1H and ^{13}C NMR, and named as 1,4 phenyl diacetate, it is first reported in sunflower. In the allelopathic study the chloroform fraction inhibited the growth of *Lactuca sativa* radicle, and the ethyl acetate stimulated it, in addition all samples inhibited cell division, stimulated the activity of some antioxidant enzymes and inhibited the respiratory activity and chlorophyll content of the same plant. The crude extract, the chloroform and ethyl acetate fraction showed high antioxidant activity in the methods of reducing the phosphomolybdenum complex and by the reduction of DPPH radical. This result may be related to the high concentration of total polyphenols present in them. The test of toxicity against *Artemia salina* showed that only the hexane and hidroalcoholic fractions were not toxic. Yet no samples showed hemolytic activity. The crude extract was not active over the tyrosinase enzyme. The nutritional evaluation revealed that the sunflower seedling has high water and protein content and, low fat, fiber and vitamin C.

Key words: *Helianthus annuus* L., asteraceae, allelopathic activity, antioxidant activity, toxicity, nutritional evaluation.

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento do interesse pela alimentação e nutrição relacionado à busca de hábitos mais saudáveis, os alimentos são muito importantes, pois com algumas mudanças de hábitos alimentares é possível viver com mais saúde (BUBNIAK, 2004).

A alimentação, quando adequada, e respeitando a individualidade, é um dos fatores determinantes para uma boa saúde e prevenção de doenças. Para manter o organismo saudável é importante o consumo de produtos naturais de caráter alimentício, como mel, missô, brotos germinados e outros. Principalmente nos dias de hoje onde ocorre uma exposição constante a agentes poluentes presentes na água, no ar e na terra (BONTEMPO, 1997).

Em toda a história as plantas e os alimentos são usados como fonte de agentes profiláticos para prevenção e tratamento de doenças em humanos e animais. A compreensão do papel dos alimentos na manutenção da saúde e cura de doenças tem suas origens nas culturas antigas e seus documentos como as escrituras chinesas, a ayurveda indiana, a grega com os conhecimentos de Hipócrates que contextualizou a relação entre o uso apropriado dos alimentos para a saúde e seus benefícios terapêuticos (BAGCHI, 2008; HANINNEN, SEM, 2008).

Originalmente alimentos que contém propriedades de modular funções corporais e contribuir com a prevenção de doenças foram chamados “Alimentos Funcionais”. Este conceito de alimentos funcionais foi proposto primeiramente pela sociedade acadêmica japonesa por volta de 1980. Hoje este termo é amplamente entendido como alimentos que apresentam determinados efeitos biológicos além do efeito de seus nutrientes comuns, baseado em validações científicas (HANINNEN, SEM, 2008).

A capacidade de alguns alimentos derivados de plantas em reduzir o risco de doenças crônicas é associada em parte, aos metabólitos secundários (fitoquímicos), que tem demonstrado exercer uma ampla variedade de atividades biológicas. Estes metabólitos apresentam uma baixa potência como compostos bioativos quando comparados com drogas farmacêuticas mas, quando ingeridos regularmente e, em quantidades significativas como parte da dieta podem ter um notável efeito fisiológico. Metabólitos que estão presentes nas dietas e estão

associados a benefícios para saúde incluem glucosinolatos, terpenoides (carotenoides, monoterpenos, fitoesteróis) e vários grupos de polifenóis (antocianinas, flavonas, isoflavonas, ácido elágico, entre outros). A bioatividade destes compostos é em parte associada às propriedades antioxidantes que estão envolvidas na prevenção do desenvolvimento de doenças crônicas degenerativas (ESPÍN, GARCIA-CONESA, TOMÁS-BARBERÁN, 2007).

Nesse contexto, o girassol se destaca. A planta é originária do sudoeste dos Estados Unidos e norte do México. Foi primeiramente utilizada como alimento pelos índios americanos e cultivada inicialmente para o consumo de sua semente. A seguir sua farinha começou a ser utilizada na preparação de alimentos e somente no início do século XVII, na Europa, começou a ser utilizada como planta oleaginosa, quando se idealizou um método prático de extração do óleo da semente de girassol (ROSSI, 1997; MANDARINO, 1997).

A finalidade da produção do girassol é a extração do óleo comestível e mais de 90% da produção mundial destina-se à elaboração do mesmo (ROSSI, 1997).

Mais um alimento proveniente desta planta passou a fazer parte da alimentação: o broto de girassol, o qual é consumido por um grupo específico de pessoas, principalmente vegetarianos. O alimento é produzido e preparado pelo consumidor, principalmente como suco e acompanhamento de saladas. As sementes, após plantadas, crescem por volta de 10 a 15 dias e os brotos são retirados da terra na hora do consumo. Sugere-se que este é um alimento saudável e com muita vitalidade.

Diante do exposto e da necessidade de hábitos de vida saudáveis, a pesquisa de espécies que possam fornecer qualidade de vida se faz necessário. Os brotos do girassol são facilmente produzidos pelo próprio consumidor, são orgânicos e bem aceitos entre os adeptos da alimentação saudável.

Apesar disso, o broto de girassol ainda não foi estudado quimicamente e pouco se sabe sobre suas atividades biológicas. O presente trabalho visa delinear o perfil fitoquímico dos brotos de girassol e conhecer algumas das atividades biológicas que o mesmo apresenta, sendo ponto de partida para estudos maiores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo fitoquímico preliminar, nutricional e de atividades biológicas do broto de girassol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar prospecção fitoquímica para o conhecimento dos principais metabólitos com interesse biológico, isolar e identificar compostos;
- Verificar perfil de ácidos graxos da fração hexano;
- Quantificar os polifenóis totais no extrato bruto, fração clorofórmio e acetato de etila;
- Avaliar a toxicidade, atividade alelopática, atividade hemolítica e atividade antioxidante do extrato e frações;
- Avaliar a influência do extrato bruto sobre a enzima tirosinase;
- Determinar a composição de açúcares totais, proteínas, lipídeos, fibras e vitamina C das plântulas de girassol.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ALIMENTAÇÃO SAUDÁVEL E DOENÇAS CRÔNICAS NÃO TRANSMISSÍVEIS

As doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT) são as principais causas de morte no Brasil. O grupo das DCNT compreende majoritariamente doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas, estando relacionadas à alta ingestão de alimentos ricos em colesterol, ácidos graxos saturados, associada ao baixo consumo de fibras (PINHEIRO, TORRES, CORSO, 2004).

Para o controle e prevenção destas doenças é importante ressaltar a necessidade de ações de educação em alimentação e nutrição, uma vez que, uma alimentação equilibrada e saudável contribui para a prevenção das mesmas e o consumo alimentar habitual é considerado um dos principais fatores passíveis de modificação (ANJOS, SOUZA, ROSSATO, 2009).

O consumo diário e suficiente de frutas e hortaliças é um importante fator protetor por serem fontes de micronutrientes, fitoquímicos, fibras, ácidos graxos insaturados além de possuírem baixa densidade energética (SANTOS, DUARTE, 2009).

A combinação de atividade física, alimentos variados e interação social extensiva é o perfil de estilo de vida que mais pode contribuir para a otimização da saúde, refletida em um aumento da longevidade e envelhecimento saudável (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003).

3.1.1 O consumo de brotos

O consumo de vegetais tem sido associado a uma dieta saudável, pois, além de possuírem os micronutrientes, também possuem os fitoquímicos ou metabólitos secundários que desempenham ações biológicas, auxiliando na manutenção da saúde do organismo.

A utilização dos brotos é prática milenar no Oriente. Seu uso é difundido e apreciado na China, Japão e Estados Unidos e está crescendo no Brasil. O broto de feijão muito consumido pela comunidade nipônica e conhecido como *moyashi* é o mais consumido nestas regiões. Também são produzidos os brotos de lentilha, alfafa, trevo e girassol (LOURES *et al.*, 2009).

Existe um interesse crescente no consumo de brotos devido à procura por alimentos naturais e de alto valor nutritivo (LIMA *et al.*, 2004).

O broto de brócolis, por exemplo, é uma fonte rica em isotiocianatos, uma classe que apresenta atividade quimiopreventiva. O isotiocianato sulforafano (Figura 1) está presente em grandes quantidades nos brotos de brócolis. Este composto reduz a colonização por *Helicobacter pylori* e atenua gastrite em animais e em humanos (YANAKA *et al.*, 2009).

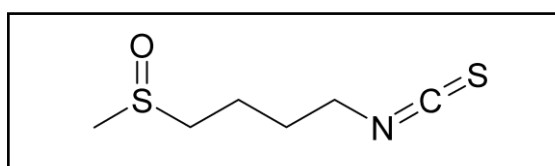


Figura 1 – Representação do Composto Sulforafano
Fonte: MOON *et al.*, 2010

3.2 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Helianthus annuus* L.

Helianthus annuus L. constitui os seguintes níveis de organização apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Enquadramento Taxonômico de *Helianthus annuus* L.

	CRONQUIST (1988)	ENGLER (JOLY, 1985)
Reino	Plantae	Plantae
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae (Anthophyta)
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Asteridae	Asteroideae
Ordem	Asterales	Campanulales (Synandreae)
Família	Asteraceae	Compositae
Gênero	<i>Helianthus</i>	<i>Helianthus</i>
Espécie	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Helianthus annuus</i>

3.2.1 Família Asteraceae

A família Asteraceae ou Compositae compreende cerca de 1.100 gêneros, com aproximadamente 25.000 espécies, representando a maior família de angiospermas. Encontrada principalmente em regiões temperadas ou subtropicais (BARROSO, 1991).

Estas podem ser ervas, subarbustos, trepadeiras ou árvores. Os gêneros que constituem esta família em geral são plantas de pequeno porte. As flores são reunidas em inflorescência característica, chamada capítulo, são hermafroditas ou de sexo separado, podendo estar na mesma inflorescência (JOLY, 1985).

A química desta família é muito importante para o sucesso na manutenção da sua evolução. O sucesso inicial provavelmente apareceu com a descoberta da combinação da defesa efetiva dos poliacetilenos e das lactonas sesquiterpênicas. A contínua expansão desta família foi mantida pela habilidade de evoluir sua estrutura química, a qual permitiu o desenvolvimento de novos repelentes. A função futura desta família na vegetação mundial provavelmente dependerá mais de uma contínua evolução química do que das mudanças morfológicas dentro do grupo (CRONQUIST, 1988).

3.2.2 Gênero *Helianthus*

As espécies do gênero *Helianthus* são cultivadas como plantas ornamentais e como produtoras de sementes oleaginosas (BARROSO, 1991).

O gênero *Helianthus* inclui 49 espécies, 19 subespécies, com 12 espécies anuais e 37 perenes, com distribuições nativas principalmente na América do Norte (OLIVEIRA, CASTIGLIONI, CARVALHO, 2005).

As espécies que compõe este gênero em geral têm uma grande habilidade de hibridização entre elas. A hibridização é tão comum entre este gênero que a descoberta de uma combinação natural híbrida interespecífica no gênero é dificilmente percebida (TIMME, SIMPSON, LINDER, 2007).

A espécie mais importante do ponto de vista comercial é o girassol, *Helianthus annuus* L., o qual é utilizado como semente oleaginosa na alimentação. Outra espécie importante para a alimentação é *H. tuberosus* L., da qual se aproveitam os tubérculos comestíveis. Outras espécies como *H. argophyllus* T. y G., *H. debilis* Nutt., *H. decapetalus* L., *H. maximiliani* Schrad e *H. salicifolius* A. Dietr. são comercializadas pelo valor ornamental (OLIVEIRA, CASTIGLIONI, CARVALHO, 2005).

A diversidade genética deste gênero está relacionada com a diversidade de ambientes onde se encontram as diferentes espécies. Algumas são típicas de ambientes secos e solos arenosos, enquanto outras são encontradas em ambientes úmidos (OLIVEIRA, CASTIGLIONI, CARVALHO, 2005).

3.2.3 A espécie *Helianthus annuus* L.

O México foi o local de domesticação desta planta. O girassol cultivado surgiu do silvestre, considerado uma planta daninha nos campos dos índios americanos. Inicialmente foi cultivado para o consumo de sua semente, e seu uso como oleaginosa apareceu por volta de 1918 (DALL'AGNOL, VIEIRA, LEITE, 2005; ROSSI, 1997).

A importância da cultura do girassol no mundo é devido à qualidade do óleo extraído de suas sementes (ROSSI, 1997).

A espécie *Helianthus annuus* L. é encontrada principalmente nos Estados Unidos e em menor quantidade em outras localidades como México, Bolívia, Quênia e Madagascar, como pode ser observado no mapa de localização extraído do *Missouri Botanical Garden*.



Figura 2 – Mapa de localização da espécie *Helianthus annuus* L.

Fonte: Missouri Botanical Garden, 2009

3.3 CULTIVO DO GIRASSOL NO BRASIL

O cultivo de girassol no Brasil iniciou na época da colonização da região Sul do país. A primeira indicação de cultivo comercial foi por volta de 1960, em São Paulo, quando a Secretaria da Agricultura distribuiu sementes aos agricultores (PELEGRINI, 1985).

Apenas a partir de 1998 o girassol (Figura 3b) tornou-se uma cultura importante para o Brasil sendo cultivado nos estados do Rio Grande do Sul, Goiás e Mato Grosso do Sul, como segundo cultivo de verão, pois possui características de maior tolerância à seca e evita a ociosidade no período de entressafra (DALL'AGNOL, VIEIRA, LEITE, 2005). O ciclo desta planta possui 120 dias, podendo ser cultivada duas vezes em um ano. O período de janeiro a março corresponde à segunda época e, é a que desperta maior interesse, pois possibilita

uma segunda colheita no ano agrícola e na mesma área ocupada por outras culturas (PELEGRINI, 1985).

No Brasil existem desafios em relação à cultura do girassol, pois ainda falta experiência, tradição e mercado. Existe um potencial para a produção em larga escala, porém isto depende do interesse da indústria de óleos vegetais por sua exploração e da remuneração paga ao produtor. Existem outros desafios em relação aos agricultores, pois esta deve ser uma cultura alternativa e mais uma matéria-prima oleaginosa às indústrias de processamento de outros grãos, além de oferecer ao mercado um óleo comestível de alto valor nutritivo (DALL'AGNOL, VIEIRA, LEITE, 2005).

Para seu crescimento e desenvolvimento as principais exigências são: um nível mínimo de umidade do solo para o plantio, proteção contra os ventos fortes para evitar o tombamento em épocas de colheita e que se evite a colheita em épocas de chuva (PELEGRINI, 1985).

Duas são as fases de desenvolvimento do girassol: vegetativa e reprodutiva. O período vegetativo começa com a emergência das plântulas e termina com o início do aparecimento da inflorescência. A etapa reprodutiva começa com o aparecimento da inflorescência e termina com a maturação da planta (CASTRO, FARIAS, 2005).

O presente estudo foi realizado com o girassol na fase de desenvolvimento, chamada emergência, quando os cotilédones emergem na superfície do solo, finalizando o primeiro par de folhas verdadeiras (Figura 3a).



Figura 3 – [A] Broto de Girassol [B] Girassol

Fonte : a autora

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.4.1 Atividade Alelopática

Rice (1984) definiu alelopatia como: “qualquer efeito direto ou indireto danoso ou benéfico que uma planta (incluindo microrganismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente”.

O uso indiscriminado de herbicidas resultou no aumento da incidência de ervas daninhas resistentes. Os herbicidas modernos melhoraram a qualidade de muitos produtos provenientes da agricultura, mas em contrapartida apresentam diversos efeitos indesejáveis como a contaminação residual, resistência, deficiências no ecossistema, poluição ambiental e riscos para a saúde. O uso de fitotoxinas naturais provenientes de plantas que atuam como herbicidas podem ajudar a superar estes problemas. As plantas se adaptam às condições físicas para sua defesa produzindo um amplo espectro de metabólitos secundários, que podem ser ativos agentes alelopáticos (MACÍAS *et al.*, 1997).

Os agentes alelopáticos pertencem a diversas classes de metabólitos secundários podendo ser: ácidos orgânicos solúveis em água, lactonas simples insaturadas, ácidos graxos de cadeia longa, poliacetilenos, naftoquinonas, antraquinonas, quinonas complexas, fenóis simples, ácido cinâmico e derivados, flavonoides, taninos, terpenoides, esteróides, aminoácidos e polipeptídeos, alcalóides, cumarinas, purinas, álcoois e nucleosídeos (DIAS, 2005).

Macías *et al.* (1997) testaram flavonoides isolados de *Helianthus annuus* em sementes de *Lycopersicon esculentum* e *Hordeum vulgare*, e verificaram inibição da germinação e do crescimento. Estes flavonoides provavelmente fazem parte da atividade alelopática da planta.

Existem relatos sobre a atividade regulatória na germinação e crescimento da planta exercida por lactonas sesquiterpênicas. Um estudo realizado por Macías *et al.* (1996) testou lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Helianthus annuus* sobre a germinação e crescimento das sementes de *Lactuca sativa* var. *nigra*, *Lepidium sativum*, *Lycopersicon esculentum*, (dicotiledôneas), *Hordeum vulgare* e *Triticum estivum*, (monocotiledôneas). Algumas estruturas apresentaram efeito inibitório

enquanto outras apresentaram efeitos estimulantes sobre a germinação e o crescimento das plantas, sendo que todas apresentaram algum efeito alelopático.

Isolou-se o composto sundiversifolida (Figura 4) do exsudato de sementes germinadas de *Helianthus annuus*, o qual apresentou atividade alelopática, pois inibiu o crescimento de sementes de *Lactuca sativa*, *Celosia cristata*, *Lycopersicum esculentum*, *Digitaria ciliaris* e *Echinochloa crus-galli* (OHNO, et al., 2001).

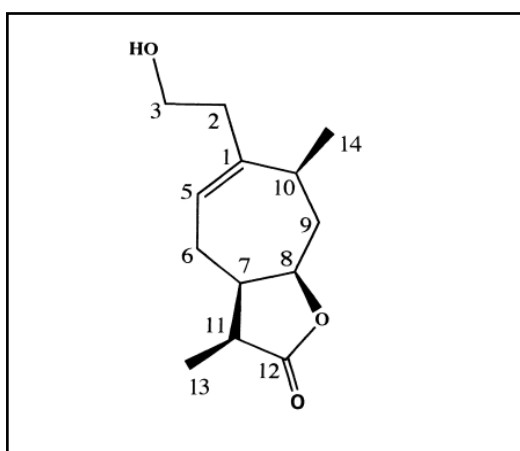


Figura 4 – Representação do Composto Sundiversifolida

Fonte: OHNO *et al.*, 2001

O sesquiterpenoide dímero, helivypolide G (Figura 5), foi isolado por Macías *et al.* (2004) da fração polar média de *Helianthus annuus*. Este composto apresentou atividade alelopática, pois inibiu o crescimento de coleótilos de trigo em até 72%.

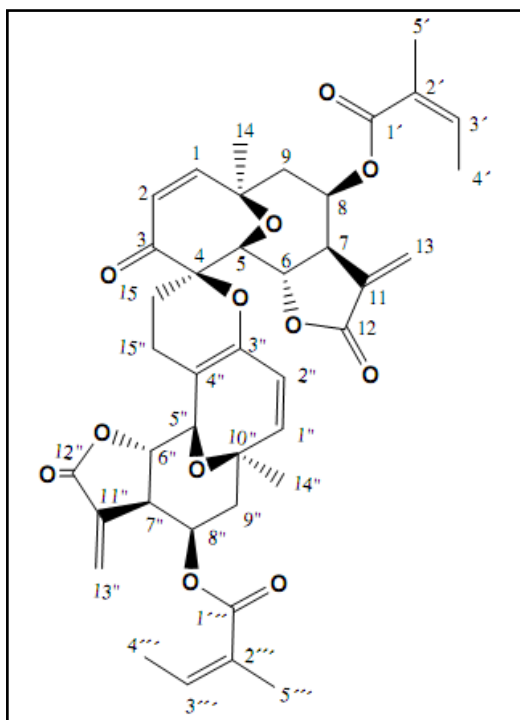


Figura 5 – Representação do Composto Helivypode G

Fonte: MACÍAS *et al.*, 2004

3.4.2 Atividade Antioxidante

A oxidação no organismo ocorre devido à ação de radicais livres que são formados nos processos biológicos. As reações de oxidação estão associadas a doenças degenerativas, devido aos danos oxidativos provocados no DNA, proteínas e outras macromoléculas. O organismo controla estas reações por meio de mecanismos antioxidantes que diminuem a atividade dos radicais livres. Os antioxidantes presentes nas plantas e alimentos são capazes de regular a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres, sendo importante a ingestão destes compostos na alimentação (VEDANA, 2008).

Giada e Mancini-Filho (2008) verificaram a capacidade antioxidante de extratos dos cotilédones das sementes de girassol e observaram uma alta capacidade antioxidante do extrato aquoso. A partir destes resultados sugere-se que o consumo desta semente pode prevenir reações oxidativas *in vivo* responsáveis pelo desenvolvimento de diversas doenças, como o câncer.

Em outro estudo realizado por Weisz, Kammerer e Carle (2009), compostos fenólicos foram extraídos das sementes e cascas das sementes de girassol desengordurado. O total de compostos fenólicos que compõe a base da matéria seca demonstrou que uma refeição com o girassol desengordurado pode ser utilizada como antioxidante natural. Além disso, os resíduos da extração do óleo demonstraram-se ainda ricos em fenólicos antioxidantes.

3.4.3 Atividade Microbiológica

O uso exacerbado de antibióticos no tratamento de doenças infecciosas, e o aparecimento de cepas resistentes a diversos medicamentos direcionaram os estudos para agentes antimicrobianos presentes nas plantas. Estes estudos têm demonstrado que as plantas representam uma fonte potencial de agentes antimicrobianos (SASAKI, 2008; SECHI *et al.*, 2001).

Por meio de ensaio biológico com o óleo de girassol, Sechi e colaboradores (2001) detectaram atividade antimicrobiana deste óleo pela inibição no crescimento de algumas espécies de *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Mendieta, Giudici e Canal (2004), detectaram a presença de uma tripsina inibidora em sementes de girassol com atividade antifúngica. A proteína isolada foi responsável pela inibição da germinação de esporos do fungo patogênico *Sclerotinia sclerotiorum*.

3.5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.5.1 Terpenoides

Os terpenoides são substâncias que tem como origem biossintética unidades de isopreno que são unidades pentacarbonadas (Figura 6). Os diterpenos

(20 unidades de carbono) são encontrados nos óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos. Nestes óleos um dos compostos terpênicos mais freqüentes são os sesquiterpenos que possuem 15 unidades de carbono (SIMÕES, SPITZER, 2007).

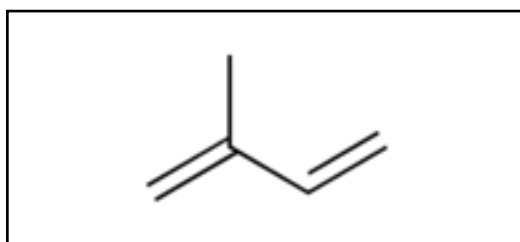


Figura 6 – Representação do Composto
Isopreno

Fonte: SIMÕES, SPITZER, 2007

Dois dos grupos mais abundantes de metabólitos secundários presentes no gênero *Helianthus* são os sesquiterpenos especialmente guaianolídeos, heliangolídeos e diterpenos (MACÍAS *et al.*, 2004).

Estudos químicos demonstraram que a espécie *Helianthus annuus* L. é uma rica fonte de terpenoides, particularmente sesquiterpenoides. Macías *et al.* (2002) isolaram e identificaram sesquiterpenoides de *H. annuus* L. cv. Peredovick.

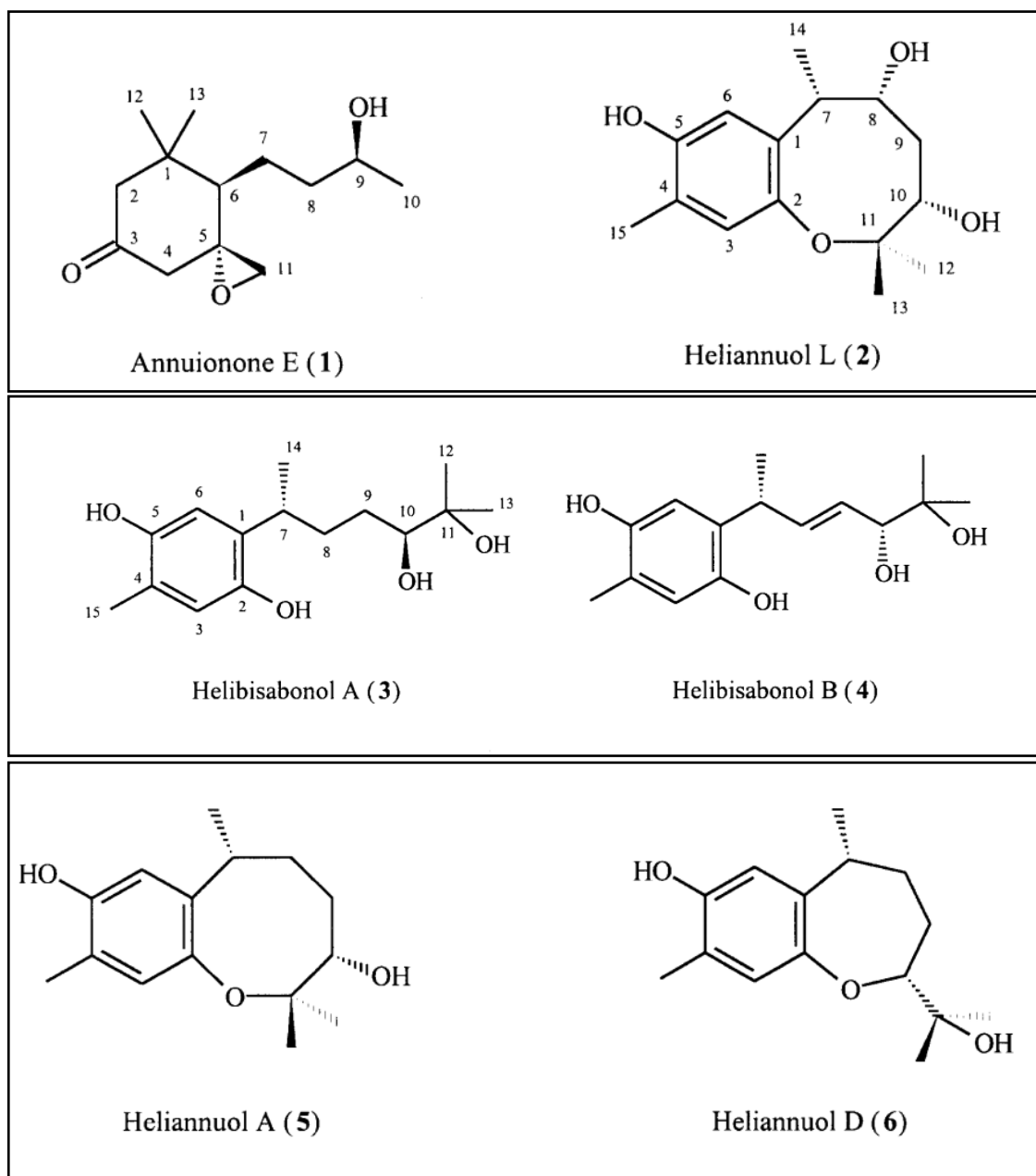


Figura 7 – Estruturas de sesquiterpenoides isolados de *Helianthus annuus* L.
 Fonte: MACÍAS *et al.*, 2002

Lactonas sesquiterpênicas de *H. annuus* foram isoladas e identificadas por Macías *et al.* (2006).

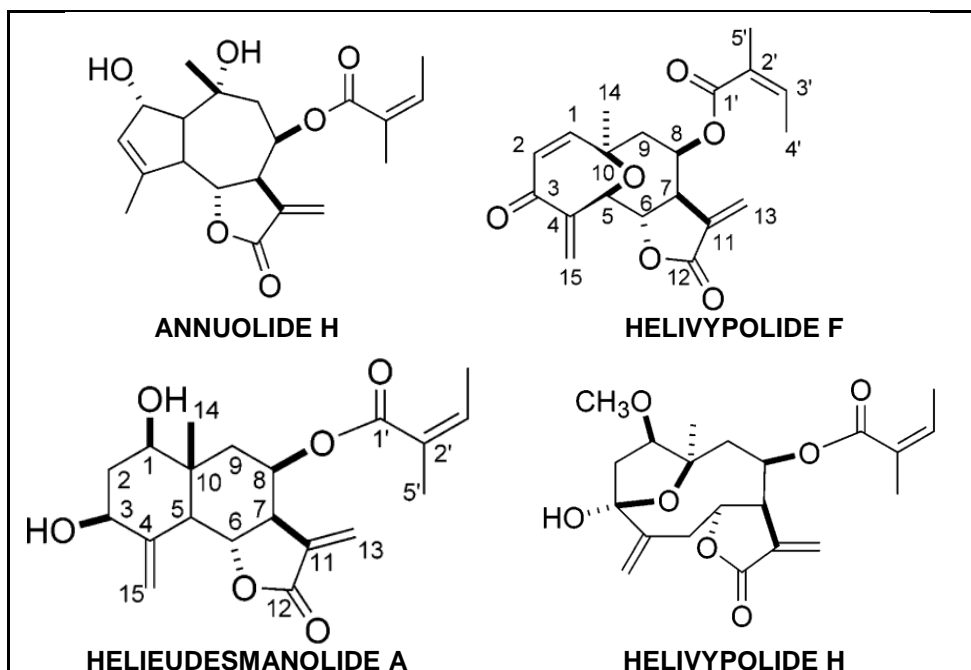


Figura 8 – Estruturas de lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Helianthus annuus* L.

Fonte: MACÍAS *et al.*, 2006

Díaz-Viciedo *et al.* (2008) isolaram três diterpenoides do extrato de éter de petróleo, da cabeça do *Helianthus annuus* L., que possuem atividade antiinflamatória pela redução na liberação do TNF- α e, inibição da COX-2 e NOS-2.

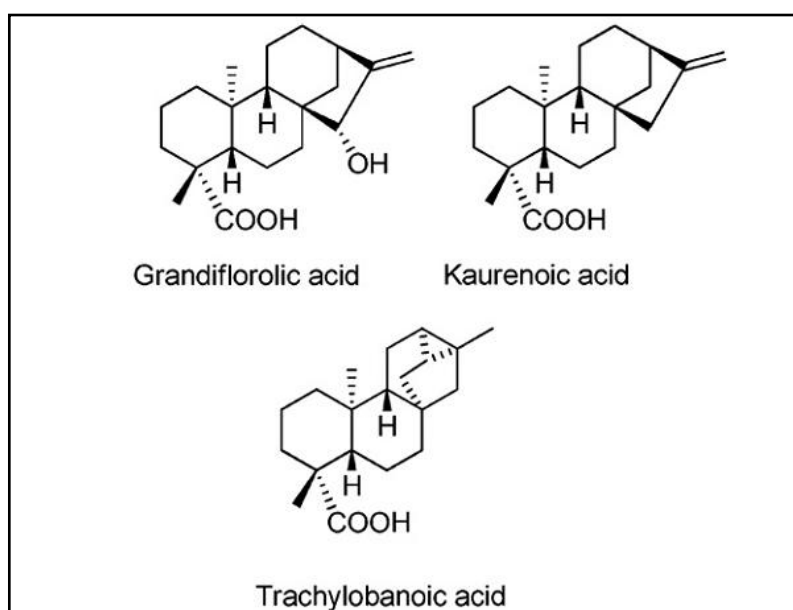


Figura 9 – Estrutura de diterpenoides isolados de *Helianthus annuus*

Fonte: DÍAZ-VICIEDO *et al.*, 2008

Um diterpeno, Helikauranoside A com bioatividade foi isolado por Macías *et al.* (2008).

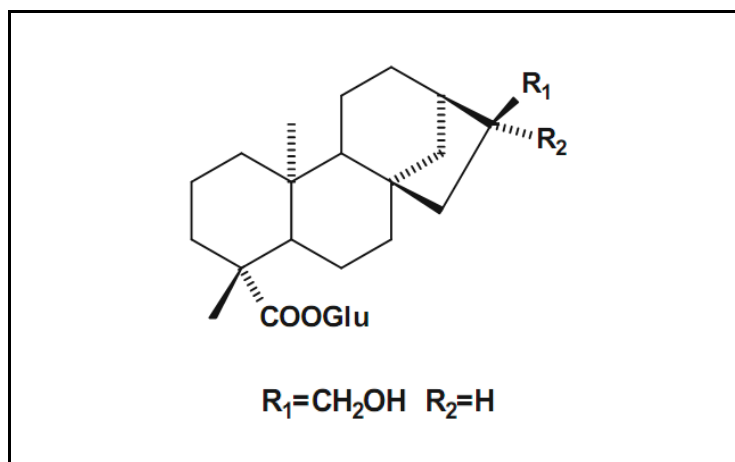


Figura 10 – Estrutura do diterpenoide Helikauranoside A
Fonte: MACÍAS *et al.*, 2008

3.5.2 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis, estão amplamente distribuídos no reino vegetal, principalmente em angiospermas, e se apresentam em abundância. Esta classe de compostos possui uma série de funções nas plantas, como por exemplo, função antioxidante, alelopática e inibidora de enzimas (SIMÕES, SPITZER, 2007).

Esta classe de compostos é encontrada em grande quantidade nos alimentos, principalmente frutas e verduras. Possuem um amplo espectro de atividades biológicas e farmacológicas, pois apresentam atividade antitumoral, antiinflamatória e antioxidante (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Foram isolados cinco flavonoides com atividade alelopática da espécie *H. annuus* L.: tambulin (1), kukulkanin (2), heliannone A (3), heliannone B (4), heliannone (5) (MACÍAS *et al.*, 1997).

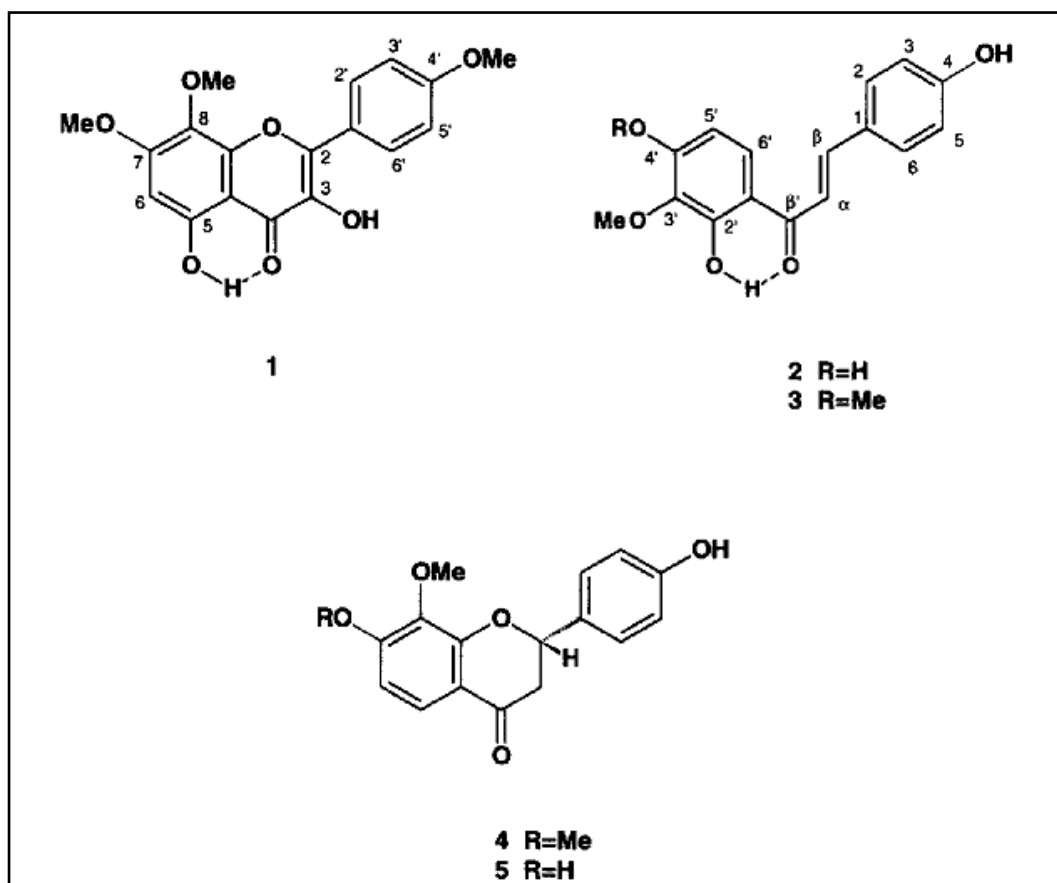


Figura 11 – Flavonoides de *H. annuus* L.

Fonte: MACÍAS *et al.*, 1997

3.5.3 Cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas no reino vegetal, e também podem ser encontradas em fungos e bactérias. Cerca de 1300 cumarinas já foram identificadas de fontes naturais. Apresentam propriedades farmacológicas e aplicações terapêuticas. A biossíntese das cumarinas ocorre em tecidos específicos, e é induzida em resposta ao estresse que pode ser tanto biótico como abiótico (SIMÕES, SPITZER, 2007; HURTADO *et al.*, 1998).

As cumarinas escopoletina e aiapina (Figura 12) são encontradas no girassol, acumulam-se nos tecidos da planta após lesão mecânica, ataque por insetos ou inoculação com fungos. Apresentam atividade antifúngica contra o fungo *S. sclerotiorum*, e em concentrações apropriadas podem efetivamente controlar a colonização por fungos no girassol (URDANGARÍN *et al.*, 1999).

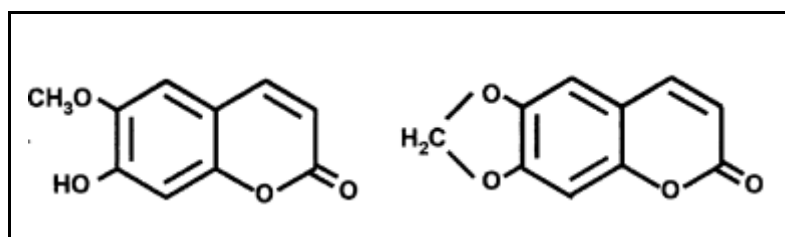


Figura 12 – Estrutura das Cumarinas Escopoletina e Aiapina

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.1.1 Determinação de Umidade

Utilizou-se o método gravimétrico da Farmacopéia Brasileira (1988) para a determinação de umidade do material vegetal obtido.

Pesou-se aproximadamente um grama da planta seca e *in natura* com três amostras, feito em cadinho previamente seco, resfriado em dessecador e pesado. O material foi submetido à estufa a 100-105°C durante 3 horas e após resfriado à temperatura ambiente, em dessecador, é novamente pesado. O cadinho com o material é colocado novamente na estufa e depois de uma hora, é pesado após resfriamento, observando-se peso constante, ou não diferindo por mais de 5mg entre as duas últimas pesagens.

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988), a quantidade excessiva de água em material vegetal propicia desenvolvimento de insetos, microorganismos e hidrólise, resultando em deterioração do material e dos constituintes do mesmo.

4.1.2 Determinação de Cinzas Totais

Para a determinação de cinzas totais no material vegetal, foi utilizado o método descrito na Farmacopéia Brasileira (1988). O método estabelece a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração.

O material vegetal foi pesado em cadinho previamente calcinado, resfriado e pesado e procedeu-se a incineração, em mufla, até eliminação do carvão. Após, foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado.

Foi calculada a porcentagem de cinzas em relação à planta seca e *in natura*.

4.1.3 Determinação do Teor de Lipídeos Totais

Os lipídeos totais foram extraídos a frio pelo método de Bligh e Dyer (1959). Pesou-se 5g da planta *in natura*, a extração de lipídeos foi feita com mistura de clorofórmio, metanol e água nas seguintes proporções: 1:2:0,8, respectivamente. Com a posterior diluição em clorofórmio e água, ocorre a separação da fase clorofórmica que contém os lipídeos e a metanólica que contém os compostos não lipídicos. 5mL do extrato clorofórmico foram colocados em estufa a 105°C por 30 min. Após secagem e resfriamento em dessecador, pesou-se a amostra.

4.1.4 Determinação de Proteína Bruta

Determinada pelo método Kjeldahl, de acordo com a metodologia nº 4.12 do Instituto Adolfo Lutz (2008).

Este método foi realizado em 3 etapas. Para a primeira etapa que corresponde a digestão, pesou-se 0,1g da amostra *in natura*, e colocou-se em tubo de digestão. Acrescentou-se 1g de mistura catalítica (CuSO_4 e K_2SO_4). Adicionou-se 5mL de ácido sulfúrico concentrado. Aqueceu-se o tubo em bloco digestor, iniciando com 50°C aumentando lentamente até atingir 400°C. Continuou-se a digestão até que as paredes internas do tubo ficassem límpidas, a fumaça de dióxido de enxofre praticamente cessar e o líquido apresentar coloração verde. A segunda etapa corresponde à destilação. Após esfriamento à temperatura ambiente dilui-se com 10mL de água destilada. Em um erlenmeyer colocou-se 10mL de ácido bórico a 4% e 5 gotas de indicador vermelho de metila mais verde de bromo cresol. Conectou-se o tubo ao destilador de Kjeldahl e adicionou-se quantidade suficiente de NaOH 50% até alcalinização completa. Destilou-se até a obtenção de aproximadamente 50mL de solução que recebeu o destilado no erlenmeyer. Na terceira etapa foi feita a titulação com solução de ácido sulfúrico 0,02N até a viragem do indicador de verde para rosa. Empregou-se 6,25 como fator de correção de nitrogênio/proteína para vegetais.

4.1.5 Determinação de Açúcares Totais

Pesou-se 100mg da amostra *in natura* e foi feita uma solução com 100mL de água, e utilizou-se 100 μ L da mesma para a análise.

Os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico de acordo com Dubois *et al.* (1956). Em uma série de tubos colocou-se concentrações crescentes de glucose, variando entre 20 e 70 μ g. completou-se o volume para 1ml com água destilada. Adicionou-se 1ml do reativo de fenol e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Após 20min para resfriamento realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 490nm.

4.1.6 Determinação de Fibras Totais

A determinação de fibras foi feita pelo método enzimático-gravimétrico de acordo com a metodologia n°985.29 da Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Pesou-se 1g da amostra *in natura* em béqueres e adicionou-se 50 mL de tampão fosfato. Adicionou-se 100 μ L de α amilase-termo-resistente. Cada béquer foi coberto com papel alumínio colocado em banho-maria com agitação a 95°C por 30 minutos. Após atingirem temperatura ambiente, o pH foi ajustado para 7,5 com a adição de solução NaOH. Adicionou-se 5 mg de protease e colocou-se em banho-maria a 60°C por 30 minutos sob agitação constante. Após esfriarem a temperatura ambiente, ajustou-se o pH para 4,0-4,6 com adição de solução de HCl. Adicionou-se 300 μ L de amiloglucosidase e colocou-se novamente em banho-maria a 60°C por 30 minutos. Foi adicionado 280 mL de etanol pré-aquecido em cada béquer e deixou-se em repouso por 1 hora à temperatura ambiente.

Cadinhos foram previamente pesados e a solução etanólica foi filtrada sob vácuo. Transferiu-se todo o resíduo para o cadinho com pequenas porções de etanol 78%. Cada resíduo foi lavado 3 vezes com 20mL de etanol 78%, 2 vezes com 10 mL de etanol 95% e 2 vezes com 10mL de acetona. Os cadinhos foram secos com os

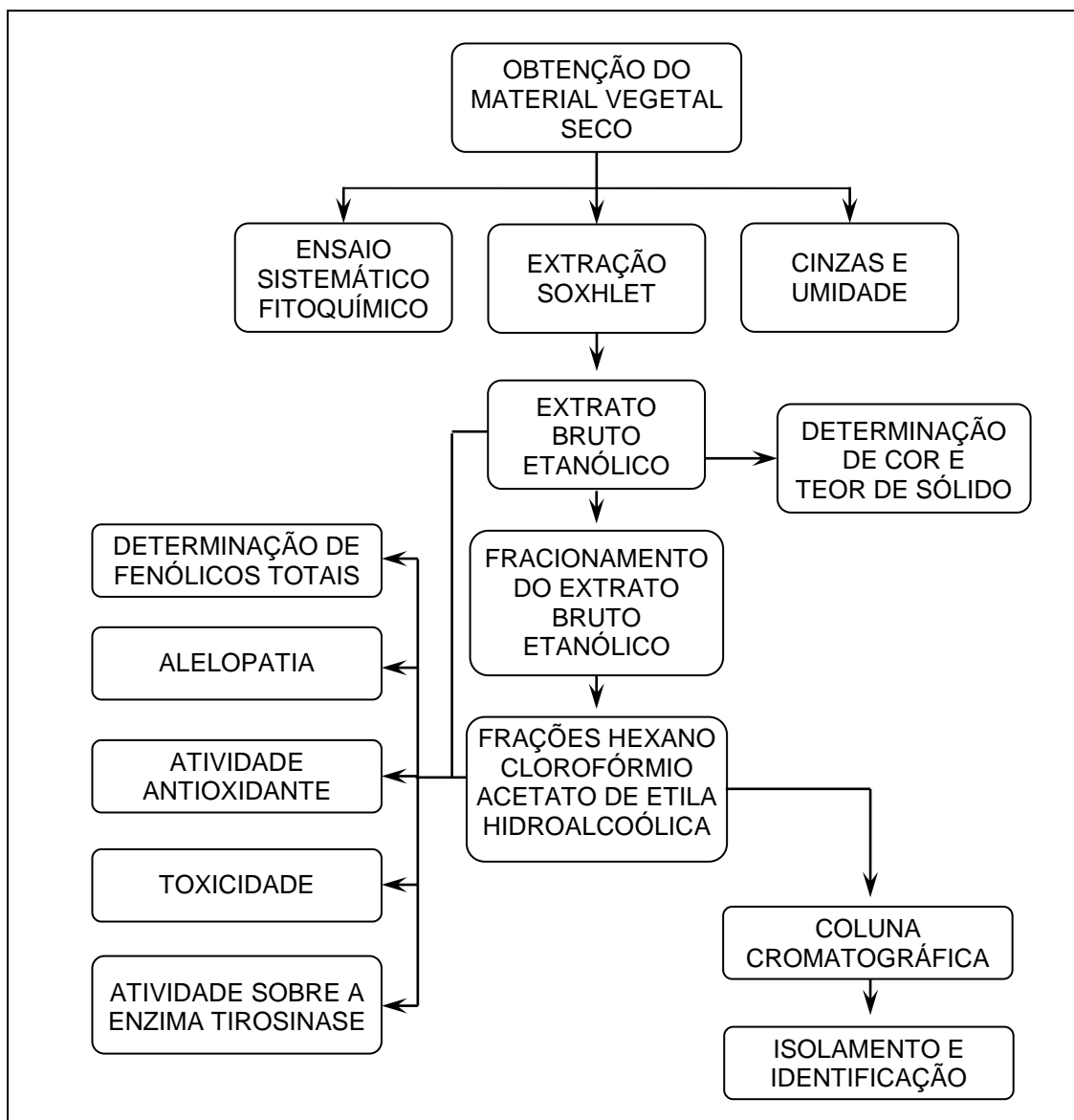
resíduos durante uma noite em estufa à 100°C. Após esfriarem em dessecador, foram pesados e os resíduos foram calculados, determinou-se proteína e cinzas que foram reduzidas do valor total para obter o valor de fibras totais.

4.1.7 Determinação de Vitamina C

A determinação de vitamina C foi feita pelo método de Tillmans, método nº365/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008), que é aplicado na análise de amostras com baixo teor de vitamina C.

Pesou-se 5g da amostra *in natura* e adicionou-se 10mL de ácido metafosfórico. A amostra foi triturada e filtrada. O filtrado foi utilizado para titular 10mL do corante.

4.2 FLUXOGRAMA DO ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS



4.3 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

Na investigação fitoquímica, os brotos coletados foram submetidos à seleção visual, excluindo-se material orgânico estranho e partes não saudáveis, atacadas por insetos, fungos ou oxidadas. Em seguida foram fragmentados e secos em estufa a

70 C° por 5 horas. Após a secagem o material foi armazenado em recipiente apropriado e protegido da luz e umidade.

4.3.1 Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica

Este ensaio analisou as características qualitativas dos principais grupos químicos que constituem os princípios ativos das drogas vegetais, utilizando em cada caso reações de coloração e ou precipitação. O ensaio sistemático de análise em fitoquímica foi realizado de acordo com Moreira (1979) pelo método de maceração, extrato aquoso a 20% (vinte por cento) e extrato hidroalcoólico a 20% (vinte por cento) do vegetal em estudo. A partir desses extratos foi determinado o resíduo seco e a presença dos seguintes grupos químicos:

- Extrato hidroalcoólico: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.
- Extrato aquoso: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos, taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

4.3.1.1 Preparo do extrato hidroalcoólico a 20%

A extração foi realizada por maceração de 40 g do broto de *Helianthus annuus* L. seco e triturado em 200 mL de álcool etílico a 70% (setenta por cento) em banho-maria a 70° C por 90 minutos. Após 24 (vinte e quatro) horas o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e o volume completado com o mesmo solvente até 200 mL. O extrato foi mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

4.3.1.2 Preparo do extrato aquoso a 20%

A extração foi realizada em banho-maria a 70°C por 90 minutos de 40 g do broto de *Helianthus annuus* L. seco e triturado em 200 mL de água destilada. Após 24 (vinte e quatro) horas o macerado foi filtrado por meio de papel de filtro e o volume completado com água destilada até 200 mL e mantido sob refrigeração até a realização dos ensaios fitoquímicos.

4.3.1.3 Pesquisa de alcaloides

Esta pesquisa foi realizada utilizando-se os reativos gerais de alcaloides (Mayer, Dragendorff, Bouchardart e Berthrand) da seguinte forma: levar à secura em banho-maria 50 mL de extrato hidroalcoólico 70%, seguido de dissolução do resíduo em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Transferir o extrato clorídrico em 5 tubos de ensaio (1 mL em cada tubo) e adicionar em cada um os reativos mantendo o quinto tubo como branco. O aparecimento de precipitado indica reação positiva. Para contraprova, 15 mL do extrato hidroalcoólico devem ser transferidos para um funil de separação e alcalinizados com hidróxido de amônio até pH 10. Efetuar extração com a mistura éter/clorofórmio (3:1) e submeter o extrato às mesmas reações de alcaloides.

4.3.1.4 Pesquisa de ácidos orgânicos

O excedente da solução etérea da pesquisa de alcalóides foi levado à secura e redissolvido em 5 mL de água destilada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

4.3.1.5 Pesquisa de fenóis

Utilizou-se 2 mL da solução obtida na pesquisa de ácidos orgânicos adicionando 2 gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. O desenvolvimento de coloração confirma a presença de fenóis.

4.3.1.6 Pesquisa de flavonoides

Os flavonóides foram pesquisados pela reação de Shinoda, ou reação de cianidina, com o extrato alcoólico total e com os extratos seletivos. Em um tubo de ensaio transferiu-se 5 mL de extrato hidroalcoólico e adicionou-se 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. A formação de cor alaranjada indica presença de flavonóis.

4.3.1.7 Pesquisa de cumarinas

Transferiu-se para um béquer 30 mL de extrato hidroalcoólico e acidificou-se até pH 1, concentrou-se em banho-maria a 60°C até 10 mL. Adicionou-se ao resíduo 5 mL de água deionizada e a extração foi feita em funil de separação com éter etílico em 3 porções de 10 mL. Reduziu-se o volume do extrato orgânico para 5 mL em banho-maria a 60°C. Três gotas do extrato etéreo foram colocadas em 2 pontos de um papel de filtro previamente marcado, deixou-se secar e adicionou-se 1 gota de hidróxido de sódio 1N em cada mancha. Cobriu-se uma das manchas com moeda e observou-se sob luz UV de ondas longas. A fluorescência azul ou verde-amarelada indica reação positiva.

4.3.1.8 Pesquisa de antraquinonas

Levou-se à fervura 20 mL do extrato alcoólico por 15 minutos sob refluxo adicionando 3 mL de ácido sulfúrico 10%. Após o resfriamento transferiu-se para um funil de separação junto com 30 mL de água destilada e extraiu-se 3 (três) vezes com 10 mL de tolueno. O extrato toluênico foi concentrado a 10 mL e transferido para um tubo de ensaio. Agitou-se com 10 mL de solução reagente de hidróxido de sódio. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas e naftoquinonas.

4.3.1.9 Pesquisa de esteróis e triterpenos

Evaporou-se 20 mL do extrato alcoólico e extraiu-se três vezes sucessivas com 5 mL de diclorometano. Concentrou-se os extratos obtidos a um volume de 3 mL e foram transferidos para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 2 mL de anidrido acético. Cautelosamente adicionou-se 3 gotas de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul passando a verde demonstra a presença de esteróides e /ou triterpenos.

4.3.1.10 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separados 3 porções de 5 mL do extrato aquoso em 3 tubos de ensaio e neutralizados com solução de hidróxido de potássio 5% até obter pH 5,5 (pH do extrato aquoso), 7,0 (neutro) e 9,5 (básico). Mudança na coloração das porções neutralizadas indica presença de heterosídeos antociânicos.

4.3.1.11 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Agitou-se os 3 tubos obtidos no ensaio de heterosídeos antociânicos energicamente durante 5 minutos. Espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico 1%.

4.3.1.12 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Transferiu-se 15 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, com o cuidado de não umedecer as paredes superiores. Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 1N e então prendeu-se com auxílio de uma rolha uma tira de papel picrossódico dentro do tubo. Levou-se o tubo de ensaio ao banho-maria em temperatura de 60°C por 30 minutos. A formação de cor vermelha no papel indica a presença de heterosídeos cianogenéticos.

4.3.1.13 Pesquisa de gomas, taninos e mucilagens

A duas porções de 5 mL do extrato aquoso adicionou-se 5 gotas de solução de acetato básico e acetato neutro de chumbo 10%. A formação de precipitado é indicativo da presença de gomas, taninos e mucilagens.

4.3.1.14 Pesquisa de taninos

Adicionou-se a 5 mL de extrato aquoso, 5 gotas de cloreto férrico 1%. Na formação de precipitado escuro, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para um balão

de fundo chato de 100 mL e nele acrescentou-se 5 gotas de formaldeído a 37% e 4 mL de ácido clorídrico. Levou-se a mistura para o refluxo por 1 hora. Após seu resfriamento, filtrou-se a solução e o material retido foi lavado com água destilada e álcool. Se no material retido no filtro houver a formação de coloração pela adição de algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%, indica a formação de taninos condensados. Se no filtrado, pelo excesso de acetato de sódio e a adição de 10 gotas de cloreto férrico 1%, houver formação de precipitado escuro ou azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.3.1.15 Pesquisa de aminogrupos

Concentrou-se 10 mL de extrato aquoso à metade sob temperatura de 50°C. Em um papel de filtro, depositou-se 5 gotas deste extrato concentrado e após secas, nebulizou-se com solução butanólica de ninhidrina. Aqueceu-se em estufa a 90-100°C por 15 minutos. O aparecimento de cor azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O extrato bruto foi obtido a partir de 400g do material vegetal seco e moído, em sistema fechado à quente no aparelho de Soxhlet. O etanol foi o solvente extrator utilizado. O material foi concentrado em evaporador rotatório até 350mL.

4.4.1 Determinação do Teor de Sólidos e Cor

A partir da concentração do extrato bruto, 1 mL foi colocado em placa de petri para determinação do teor de sólidos. Foram feitas cinco repetições levando as

placas previamente pesadas à estufa. O teor foi determinado quando a massa da placa passou a ser constante nas pesagens. Com estes valores foi calculado o teor de sólidos em relação à quantidade de material vegetal utilizado. Para determinação da cor utilizou-se a verificação feita pelo observador.

4.5 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES

O extrato bruto etanólico foi fracionado separadamente, por meio de partição líquido-líquido, em aparelho de soxhlet, com solventes de polaridade crescente, obtendo-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

Todo o sistema foi levado ao aquecimento e deixado em refluxo contínuo por aproximadamente 6 horas cada fração.

4.6 CROMATOGRAFIA GASOSA DA FRAÇÃO HEXANO

Foram identificados os ácidos graxos com cromatografia gasosa, foram detectados os picos correspondentes aos ácidos graxos saturados e insaturados. Foi utilizada para a análise uma coluna de aço inoxidável DB-23 (60m x 0,25 diâmetro interno x 0,25 filme) e para fase estacionária (50% cianopropil)-metilpolisiloxano.

Pesou-se exatamente cerca de 100mg da fração hexano. Adicionou-se 10 mL Hexano + 100 µL KOH 0,2N (1,12g KOH / 10ml MeOH). Agitou-se no vórtex por 5 minutos. Deixou-se decantar a glicerina e adicionou-se o sobrenadante direto no vial. Foi injetado 1 µL da amostra. O óleo foi cromatografado sob as seguintes condições de trabalho: fluxo de 30 ml/ min (Gás Hidrogênio), CG (cromatógrafo gasoso da Agilent, mod. 6850, software EZChrom SI), temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 280°C, com detector FID.

4.7 ISOLAMENTO DAS SUBSTÂNCIAS

4.7.1 Cromatografia líquida em coluna

As frações obtidas do extrato foram passadas em coluna cromatográfica líquida com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm, e fase móvel hexano/ acetato de etila e acetato de etila/metanol. A pastilha cromatografada foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secar em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização.

Em uma coluna de vidro, preparou-se a sílica-gel que foi depositada depositada na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha. O sistema eluente iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 100% de acetato de etila, a partir deste foi utilizado metanol como gradiente, com variação de 5%.

As amostras recolhidas foram levadas a secar na temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Esses cristais foram identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H e infravermelho.

Para RMN de ^{13}C e ^1H utilizou-se espectrofotômetro Brucker ® modelo AC200 em 400MHz. Para infravermelho a amostra foi preparada em pastilha de brometo de potássio anidro comprimida em equipamento Bomem-Hartmann & Braum MB-serie e analisada em aparelho Bioered® FTS 3500 GX entre 400 e 4000 cm^{-1} .

4.8 DOSEAMENTO DE POLIFENOIS

Para o doseamento de polifenóis totais foi utilizada a metodologia de Folin-Ciocalteu. O reativo de Folin-Ciocalteu muda sua coloração de amarelo para azul na presença de compostos fenólicos. Quanto mais compostos fenólicos houver na solução maior é a intensidade da cor azul.

O doseamento foi realizado para o extrato bruto, frações clorofórmio e acetato de etila. Para a realização do doseamento foi feita uma curva padrão com ácido gálico nas concentrações de 5µg, 10µg, 15µg, 20µg, 25µg e 30µg. As concentrações foram obtidas a partir de uma solução de ácido gálico 0,25 mg/ml.

O ensaio foi realizado em triplicata para as seguintes concentrações: 40, 60, 80, 100, 120 µg/µL. As soluções foram preparadas da seguinte forma: em cada tubo de ensaio foi colocado 3,6 mL de água, 0,2 mL do reativo Folin-Ciocalteu e uma solução água/etanol 1:1 completando 120 µL em relação à amostra.

Agitou-se as soluções depois de prontas e, após 3 minutos colocou-se 0,4 mL de solução de carbonato de cálcio 10%, esperou-se 30 minutos, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760nm.

4.9 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Para pesquisa da atividade alelopática foram utilizados o extrato bruto e as frações obtidas do extrato, de acordo com o método descrito em Dias, 2005. A partir da metodologia utilizada foi possível verificar a ocorrência de efeitos inibitórios ou estimulatórios na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa*, frente às amostras testadas, em diferentes concentrações.

A escolha da semente de *Lactuca sativa* popularmente conhecida como alface foi feita por apresentar germinação rápida e uniforme (DIETZ, WINTERHALTER, 1996), ser pequena, possuir grande superfície de contato, sendo sensível ao meio que a rodeia e não requerer nenhuma manipulação além do contato no meio (MALHEIROS, PERES, 2001).

4.9.1 Preparo da Amostras

Foram preparadas soluções do extrato bruto e frações em concentrações decrescentes (0,8 mg, 0,4 mg, 0,2 mg, 0,1 mg, em 2 mL de metanol) em duplicata.

Para o preparo destas soluções foi utilizado uma solução-mãe de 1mg/mL diluídas em metanol.

4.9.2 Preparo do Material

Para as caixas gerbox foram recortados papel de filtro (Whatman nº. 6) e embebidos com as soluções preparadas com as devidas concentrações e colocados em estufa a 60°C por 24 horas para total evaporação do solvente. Em câmara de fluxo laminar, os papéis de filtro previamente secos foram colocados nos gerbox e umedecidos com 3 mL de água destilada. Após preparo das caixas gerbox, foram colocadas 20 sementes de *Lactuca sativa* em cada caixa em quatro repetições (DIAS, 2005).

Foram utilizados controles de caixas apenas com água destilada e sementes, e caixas com solvente (metanol ou clorofórmio), água destilada e sementes, nas mesmas condições do experimento. O papel filtro com solvente também foi levado à estufa para evaporação juntamente com as amostras.

Os gerbox foram protegidos da luz com papel alumínio e colocados em germinador de câmara à temperatura de 20°C. Para cada concentração prepararam-se duas caixas, uma para estudo da germinação e outra para estudo do crescimento.

Para análise estatística foi empregado o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). A verificação das diferenças de médias estatisticamente significantes foi realizada por meio do teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. O tratamento foi considerado efetivo quando pelo menos três repetições estiveram no mesmo grupo de médias (DIAS, 2005).

4.9.3 Teste de Germinação

As leituras durante a germinação foram realizadas dentro do fluxo laminar por sete dias, no mesmo horário. As sementes germinadas foram retiradas da caixa

diariamente. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado para cada repetição de cada tratamento. Este índice é calculado utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas ao Teste de Scott-Knott.

4.9.4 Teste de Crescimento

A leitura do crescimento foi realizada com o material que foi mantido no germinador por sete dias, os quais foram abertos somente no dia da leitura, último dia do teste. Para cada semente mediu-se, com auxílio de papel milimetrado, o tamanho da radícula, que posteriormente origina a raiz, e do hipocótilo, que origina o caule.

Os resultados foram submetidos ao teste de Scott-Knott para comparação das médias.

4.9.5 Índice Mitótico

Para determinação desse índice, foi empregada a metodologia descrita por Oliveira, Castiglioni e Carvalho (1996), com algumas modificações. Foram coletados de cada plântula dois centímetros da raiz primária, a partir da extremidade distal, e imersos em fixador de Farmer (3:1, etanol:ácido acético glacial), durante 2 horas, a 25 °C e, em seguida, foram transferidos para uma solução de álcool 70 % e armazenados a 8 °C. Para determinação do índice mitótico, as pontas de raízes foram tratadas na seguinte ordem: 1) água destilada por cinco minutos; 2) ácido clorídrico 1 M por 30 min à temperatura ambiente; 3) água destilada por cinco minutos e 4) azul de toluidina 2 % por 5 min. As pontas das raízes coradas tiveram o

ápice, 2,0 mm iniciais, cortado sobre lâmina de microscópio, colocando-se em seguida a lamínula e pressionando sob esta o papel de filtro para esmagamento do ápice e retirada do excesso de corante. O material foi observado em microscópio ótico comum, com aumento de 1000X, contando-se o número de células em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Para cada tratamento foram preparadas três lâminas, avaliando-se três campos/lâmina. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (interfase + mitose) multiplicando-se por 100.

4.9.6 Preparo do Material Vegetal para Testes de Atividade Enzimática

Dois gramas de material fresco foi macerado em almofariz com nitrogênio líquido. O pó resultante foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio, pH 7,0, 50 mM, contendo EDTA 2 mM e ácido ascórbico 5 mM. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato bruto para as dosagens descritas a seguir, sendo o precipitado descartado (MARQUES, XAVIER FILHO, 1991). Os extratos foram acondicionados a -18°C no Laboratório de farmacotécnica da UFPR, até o momento da análise.

4.9.7 Proteínas Totais

A quantificação foi feita pelo método descrito por Bradford (1976), pelo preparo do reagente em laboratório. A concentração de proteína dos extratos foi determinada por comparação com uma curva padrão de albumina sérica bovina, por espectrofotometria, a 594 nm de absorbância.

4.9.8 Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo método utilizado por Gupta *et al.* (1993), com modificações. A mistura de reação consistiu de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 9,9 mM, azul de nitrotetrazolium 57 μ M (NBT), riboflavina 44 mM, sendo retirados e 20 μ L de sobrenadante para 1 mL de volume final. A riboflavina foi adicionada por último no tubo contendo o meio de reação. Os tubos de vidro foram expostos dentro de uma câmara com luz fluorescente de 15 Watts por 10 minutos a 10 centímetros da luz. No ensaio, uma unidade SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do azul de nitrotetrazolium. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade da SOD foi expressa em Unidade SOD. g-1 MF.

4.9.9 Atividade da Peroxidase

Foi determinada segundo Pütter (1974). O sistema de reação continha 0,96 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), 20 μ L de pirogallol 0,1 M como substrato e 20 μ L de peróxido de hidrogênio, 0,1 M. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância em 470 nm. A atividade específica (atividade peroxidásica/ μ g proteína) foi expressa em unidades de atividade enzimática (UAE), onde uma unidade corresponde, arbitrariamente, a uma diferença de 0,001 de absorbância/minuto/ μ g de proteína (GRAY, ARNOYS, BLANKESPOOR, 1996).

4.9.10 Atividade da Catalase

O ensaio para a determinação da catalase consistiu na adição de 60 μ L de H₂O₂ 1M em uma mistura de reação contendo 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e 100 μ L do extrato enzimático. O decréscimo do H₂O₂ foi monitorado

pela absorbância a 240 nm, em intervalos de 10 segundos por um período de 1 minuto. A diferença de absorbância (ΔA_{240} nm), obtida através de regressão linear, foi dividida pelo o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 , 39,4 M⁻¹.cm⁻¹ (AEBI, 1984). A atividade da CAT foi expressa em μ mol de H_2O_2 mim⁻¹. g⁻¹ MF.

4.9.11 Atividade da Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com Duangmal e Apenten (1999), pela mensuração da conversão do catecol em quinona. O substrato utilizado foi composto por catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). Para a reação, que ocorreu a 30 °C, 900 μ L do substrato foram misturados com 100 μ L do extrato proteico. As leituras foram feitas a cada 10 s a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em unidades de PPO, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorbância de 0,001 por min de reação por mg de proteína total.

4.9.12 Atividade da α -amilase

Para a determinação da alfa amilase, o extrato foi colocado em banho-maria a 70°C durante 20 minutos, adicionando-se 0,1 mL da amostra por tubo completando o volume de 1 mL com tampão e 1 mL de solução de amido, permanecendo incubado a 30°C por 5 minutos. Após, foi adicionado 1 mL de lugol e 9 mL de água, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm (AOAC, 1995). Os resultados foram expressos em μ g de amido hidrolizado min⁻¹ g de sementes⁻¹.

4.9.13 Teor de Clorofila e Respiração

Os teores de clorofila foram obtidos após a maceração das partes aéreas das plântulas em almofariz e extração com DMSO (CAYON *et al.*, 1990), com modificações. As absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total.

A respiração potencial das células radiculares das plântulas de alface foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) pela atividade de enzimas desidrogenase e do surgimento do formazan. Para a avaliação dessa característica as raízes foram cortadas a 1 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas e em seguida transferidas para tubos de ensaio de 17x120 mm, onde foram adicionados 3 mL de TTC 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os tubos de ensaio foram mantidos sob vácuo em dessecadores, por 2 horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30 °C por 15 horas.

Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas uma vez em água destilada. Os tubos de ensaio contendo as raízes foram novamente transferidos para o banho-maria com água fervente (± 100 °C), sendo então adicionados 7 mL de etanol 95% (V/V). Decorridos 10 minutos, as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento à temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol 95% (V/V). As absorbâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm (STEPONKUS, LANPHEAR 1967).

4.9.14 Análise Estatística

Para cada extrato e frações avaliados, o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado envolvendo nove ensaios simples com quatro

tratamentos (0, 250, 500 e 1000 mg.L⁻¹), em quatro repetições. A unidade experimental constituiu-se de 50 diásporos para germinação e dez para o crescimento e massa seca. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4.10 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos. O primeiro baseia-se na formação do complexo fosfomolibdênico e o outro é caracterizado pela capacidade da amostra em reduzir o radical DPPH. Ambos utilizam leituras espectrofotométricas na região do UV.

4.10.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênico

Esse ensaio baseia-se na técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Este é um método espectrofotométrico para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas e, baseia-se na redução do molibdênio (VI) para molibdênio (V) participando da reação como agente antioxidante. Na presença de substâncias com capacidade antioxidante forma-se um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V) que é determinado espectrofotometricamente a 695 nm.

A reação para formação do complexo preparou-se um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a testadas, estavam na concentração de 200 µg/mL em metanol (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, retirou-se uma alíquota de 0,1 mL da amostra, e adicionou-se 1 mL de reativo. Realizou-se o mesmo para os padrões. O branco foi constituído de 0,1 mL de metanol e 1 mL de reativo. A análise foi realizada em

triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Manteve-se a série de tubos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Quando atingiu a temperatura ambiente, realizou-se a leitura das absorbâncias (Abs) em espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme as equações do quadro 2.

Quadro 2 – Cálculo da Atividade Antioxidante Relativa pelo Método Fosfomolibdênio

AAR% EM RELAÇÃO À VITAMINA C	$\frac{\text{Abs(amostra)} - \text{Abs(branco)}}{\text{Abs(vitamina C)} - \text{Abs(branco)}} \times 100$
AAR% EM RELAÇÃO À RUTINA	$\frac{\text{Abs(amostra)} - \text{Abs(branco)}}{\text{Abs(rutina)} - \text{Abs(branco)}} \times 100$

4.10.2 Redução do Radical DPPH

Esse ensaio foi realizado de forma qualitativa e quantitativa.

A técnica qualitativa descrita por Conforti *et al.* (2002) e Arbos (2004) baseia-se na análise da amostra por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), seguida da revelação por uma solução de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH).

O DPPH é um radical livre estável que possui um elétron sobressalente em um átomo de nitrogênio, apresenta uma cor violeta intensa, quando em contato com uma substância antioxidante doadora de hidrogênio pode ser reduzido, se tornando amarelo pálido (SHARMA, BHAT, 2009).

Selecionou-se a fase móvel e promoveu-se a migração ascendente da amostra na cromatoplaça de sílica gel SG-60 Merck[®], a revelação foi feita com uma solução de DPPH a 0,2% em metanol. Realizou-se a análise após 30 minutos sob luz natural a fim de verificar a presença de manchas amarelas contra um fundo púrpura, que indicam a presença de compostos antioxidantes na amostra. Como padrão, utilizou-se a vitamina C e rutina. Diluiu-se as amostras em metanol na concentração de 10 mg/mL.

A metodologia para o ensaio quantitativo foi adaptada e baseada nas técnicas descritas por Moreno *et al.* (2000).

De acordo com Silva, Borges e Ferreira (1999), a avaliação da capacidade antioxidante quantitativa tem como base a redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível.

Preparou-se a solução de DPPH minutos antes do ensaio a 1mM em etanol absoluto. Adicionou-se soluções estoque de amostras a 1 mL da solução de DPPH e deixou-se reagir em repouso por 30 minutos na temperatura ambiente e na ausência total da luz. As mesmas soluções da amostra (3,0 mL) sem reagir com DPPH constituem o branco da reação.

Preparou-se a rotina em etanol nas concentrações de 1 µM a 10 µM, e a vitamina C a 2 µM, 3 µM, 3,5 µM, 4 µM e 5,5 µM.

Após 30 minutos, mediu-se a Abs das soluções em 517 nm. Todas as etapas foram feitas em triplicata. Mediu-se a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) através da fórmula no quadro 3.

Quadro 3 – Cálculo da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH

$AA\% = 100 - \frac{(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco})}{Abs \text{ controle positivo}}$

Mediu-se a absorbância da solução de DPPH para o controle positivo. Calculou-se os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC_{50}) em gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo $y = ax + b$, serviu de base para determinação do valor de IC_{50} .

4.11 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado segundo Meyer *et al.* (1982).

4.11.1 Preparo da Solução Salina

A água do mar artificial foi preparada dissolvendo 14,31g de sal artificial para 400 ml de água purificada. Ajustou-se o pH para 9,0 com carbonato de sódio para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan, Anderson e Morales-Gomez (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia Salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.11.2 Eclosão dos Ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados para eclodir em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à luz diurna. Controlou-se a temperatura entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação (20W) sobre o recipiente.

4.11.3 Preparo das Amostras

O estudo foi realizado com o extrato e as frações. Pesou-se aproximadamente 20mg da amostra e adicionou-se solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10 mg/mL.

Desta solução transferiu-se 2,5, 25 e 250 µL com pipeta automática para tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000 µg/mL, em triplicata. Evaporou-se o solvente por 12 horas (KALEGARI, 2009).

4.11.4 Avaliação da Toxicidade

Após a eclosão dos ovos, 10 náuplios de *Artemia salina* foram transferidas para cada tubo de ensaio contendo as amostras e para os tubos controles. Os controles negativos consistem de tubos com o solvente solubilizador da fração, o qual foi evaporado juntamente com as amostras, além de tubos vazios. Ajustou-se o volume de todos os tubos do mar artificial para 2,5 mL.

Após 24 horas, foi realizada a contagem dos náuplios mortos e vivos com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL_{50} e 95% de intervalos de confiança. As amostras foram consideradas ativas quando a DL_{50} foi menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982).

4.12 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A avaliação da atividade hemolítica do extrato e frações foi realizada segundo a metodologia de difusão em Ágar utilizando a técnica de antibiograma em discos, descrita por Flach, Karnopp, Corção (2005), com adaptações.

Neste teste, papéis Whatmann n° 1 (7 mm de diâmetro, esterilizado) foram distribuídos sobre as placas de ágar sangue, adquiridas na empresa NEWPROV, e em seguida impregnados com alíquotas de 20 μL das frações anteriormente preparadas, na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Para controle foram utilizados 20 μL dos respectivos solventes puros, aplicados aos discos.

Para o controle positivo foi feita uma solução de saponina na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ e aplicou-se 20 μL sobre o papel. E para o controle negativo foi utilizada uma solução salina 0,9%.

Após a aplicação, os meios foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em mm).

4.13 ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE

O ensaio da avaliação da atividade da enzima tirosinase foi executado de acordo com os métodos descritos previamente por Miyazawa e colaboradores (2003) com algumas modificações.

Testou-se o extrato bruto em várias concentrações (100 – 300 - 1000µg/mL) frente à enzima tirosinase (200 U/mL), em microplaca de 96 poços. Adicionou-se a cada poço 170 µL L-tirosina 1mM ou L-DOPA 1mM, tampão fosfato de potássio 50mM (pH = 6,5), H₂O (10:10:9). Incubou-se a microplaca a 37°C por 30 minutos.

A quantia de dopacromo proveniente da reação da amostra foi determinada baseada na densidade óptica a 490nm usando espectrofotômetro. O efeito inibitório da atividade da tirosinase foi calculado em função da taxa de absorbância *versus* poço controle sem o composto ativo. Como controle positivo foi usado ácido kójico 1mM e controle negativo água destilada. (VIRADOR *et al.*, 1999).

Os dados obtidos foram avaliados por análise de variância entre grupos (ANOVA - one way) seguidos por teste de Newman-Kewls.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos nas análises físico-químicas realizadas com a planta *in natura*.

Tabela 1 – Composição Físico-Química em Porcentagem do broto de girassol, broto de feijão e broto de alfafa

Determinações	<i>In natura</i>	Planta seca	Broto de feijão (WILLS, 1984)	Broto de alfafa (USDA, 2010)	Broto de feijão (MACHADO <i>et al.</i> 2009)
Umidade (%)	94,05	5,04	-	-	95
Cinzas (%)	0,57	0,61	-	0,4	0,66
Proteínas (%)	3,11	-	3,1	3,99	-
Lipídeos (%)	0,26	-	0,1	0,69	-
Fibra Bruta (%)	0,89	-	-	1,9	2,9
Açúcares Totais (%)	1,08	-	-	0,18	-
Vitamina C (mg/100g)	4,32	-	12	-	-

O broto de girassol apresenta um alto valor de umidade, 94,05% (Tabela 1), valor similar ao citado por Machado *et al.* (2009) para o broto de feijão moyashi, que apresentou 95% de umidade.

Na determinação de cinzas, para a planta seca, o valor encontrado (0,61%) mostrou-se elevado quando comparado ao valor do broto de alfafa citado pela *United States Department of Agriculture* (USDA, 2010), 0,40%, porém é próximo ao valor de 0,66% encontrado por Machado *et al.* (2009) para a variedade de broto de feijão gandu anão.

O teor de proteínas (3,11%) e lipídeos (0,26%) são próximos aos valores relatados por Wills e colaboradores (1984) para broto de feijão (3,1% de proteína e 0,1% de lipídeos), e pela USDA (2010) para broto de alfafa (3,99% de proteína e

0,69% de lipídeos). Os brotos de alfafa, de acordo com a USDA (2010), e brotos de feijão de acordo com Wills e colaboradores (1984) possuem maior teor de fibras (1,9% e 2,9%, respectivamente) que o broto de girassol (0,89%).

Analisando os dados obtidos para determinação de açúcares totais, o valor encontrado (1,08 g/100g) é superior quando comparado ao valor obtido para o broto de alfafa (0,18 g/100g) pela USDA (2010).

O valor de vitamina C obtido corresponde a 4,32 mg/100g, sendo inferior ao valor relatado por Wills (1984) para broto de feijão (12mg/100g).

Determinou-se a composição físico-química do broto de girassol pela primeira vez no presente trabalho, portanto as comparações foram feitas com composições descritas na literatura para outros brotos consumidos pela população.

O broto de girassol é um alimento interessante do ponto de vista nutricional, pois possui alto teor de água, baixo teor de lipídeos, além de possuir baixo valor energético. A composição de macronutrientes do broto de girassol é semelhante à composição dos brotos de feijão e de alfafa, que são comercializados e consumidos pela população em geral. Constitui-se em mais uma opção no cardápio daqueles que consomem brotos. Na produção de saladas variadas em restaurantes e em casa, além de ser uma alternativa para a produção de sucos verdes, ricos em clorofila, podem substituir a couve e a grama de trigo, pois o consumo excessivo de alguns alimentos pode ser prejudicial para a absorção de determinados micronutrientes podendo acarretar em deficiências nutricionais. O consumo excessivo da linhaça, por exemplo, pode impedir a absorção da vitamina B₆ levando à deficiência desta vitamina (MARQUES, 2008).

5.2 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

5.2.1 Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica

O ensaio sistemático de análise em fitoquímica indica as principais classes de metabólitos secundários presentes na amostra. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Ensaio Sistemático de Análise em Fitoquímica de *Helianthus annuus* L.

Pesquisa	Extrato Alcoólico 20%	Extrato Aquoso 20%	Reação
Leucoantocianidinas	X		-
Alcaloides	X		-
Flavonoides	X		-
Cumarinas	X		+
Antraquinonas	X		-
Esteróis e Triterpenos	X		+
Heterosídeos Antociânicos		X	+
Heterosídeos Saponínicos		X	-
Heterosídeos Cianogenéticos		X	-
Gomas, Taninos e Mucilagens		X	+
Catequinas		X	+++
Aminogrupos		X	+

Observações: (-) Resultado Negativo; (+) Resultado Fracamente Positivo; (+++) Resultado Fortemente Positivo

Pode-se observar que no extrato alcoólico 20% houve indicação positiva para a presença de cumarinas, esteróis e triterpenos. O resultado da análise do extrato aquoso indicou a presença de taninos, catequinas e aminogrupos.

Os resultados obtidos de alguns grupos fitoquímicos como os esteróis, tripterpenos, cumarinas e aminogrupos coincidem com a composição do girassol descrita na literatura, no entanto, não foram encontradas referências à presença de taninos e catequinas (MACÍAS, *et al.*, 2002; HURTADO, *et al.*, 1998).

5.2.2 Preparo do Extrato e das Frações Hexano, Acetato de Etila, Clorofórmio e Hidroalcoólica Remanescente

Os resultados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados obtidos com o Extrato Bruto

Parâmetro	Resultados
Quantidade do vegetal	400g
Volume após concentrado	350ml
Cor	Verde
Teor de sólidos (mg/ml)	17,21

Após o fracionamento de 320ml do extrato bruto obtiveram-se as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Após a evaporação dos solventes foram calculados os rendimentos de cada amostra, apresentados na tabela 4. Pode-se observar que as frações hexano e hidroalcoólica foram obtidas em maior quantidade.

Tabela 4 – Resíduo Seco das Frações do Extrato Bruto de *Helianthus annuus* L.

Fração	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa obtida	Rendimento (%) em relação à massa inicial de planta seca
Hexano	15,23	40,31	3,8
Clorofórmio	5,54	14,66	1,38
Acetato	1,08	2,85	0,27
Hidroalcoólica	15,93	42,16	3,98

5.2.3 Determinação de Ácidos Graxos da Fração Hexano

Os ácidos graxos podem ser classificados como saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) ou poliinsaturados (AGPI). Entre os vários AGPI, destacam-se os ácidos graxos essenciais linoléico (AL) e α -linolênico (ALA), pois além de serem precursores dos demais ácidos das famílias n-6 (ômega 6) e n-3 (ômega 3) respectivamente, exercem funções farmacológicas importantes participando de reações inflamatórias, protegendo contra doenças cardiovasculares, diminuindo os níveis de colesterol e também estão relacionados à resistência imunológica (COSTA, 2007).

Pela ação de enzimas endógenas como as dessaturases e alongases, o AL é convertido em ácido aracdônico (20:4 n-6) e o ALA nos ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e decosahexanóico (DHA, 22:6 n-3), que são transformados em prostaglandinas e leucotrienos com funções imunomoduladoras (MARQUES, 2008).

Os ácidos graxos das famílias n-6 e n-3 competem pelas mesmas enzimas nos processos de conversão, e embora estas enzimas tenham mais afinidade pelos ácidos da família n-3, a conversão é influenciada pelos níveis de AL da dieta. Assim, a relação da ingestão diária de n-6 e n-3 é importante para a nutrição humana. O aumento do consumo de n-6 eleva fatores relacionados às doenças crônicas, enquanto o aumento no consumo de n-3 reduz os mesmos. Estudos indicam que as dietas ocidentais apresentam uma relação de n-6:n-3 de 15:1 sendo que a razão recomendada é em torno de 3:1, a qual proporciona melhorias na qualidade de vida (MARTIN *et al.*, 2006; FORTES *et al.*, 2007).

Realizou-se uma análise de cromatografia gasosa da composição de ácidos graxos saturados e insaturados presentes na fração hexano do broto de girassol. A figura 13 apresenta o cromatograma obtido, e a tabela 5 apresenta o tempo de retenção e percentual de ácidos graxos contidos na amostra, além de apresentar uma comparação com os ácidos graxos presentes no óleo de girassol analisados por Quiles *et al.* (2003).

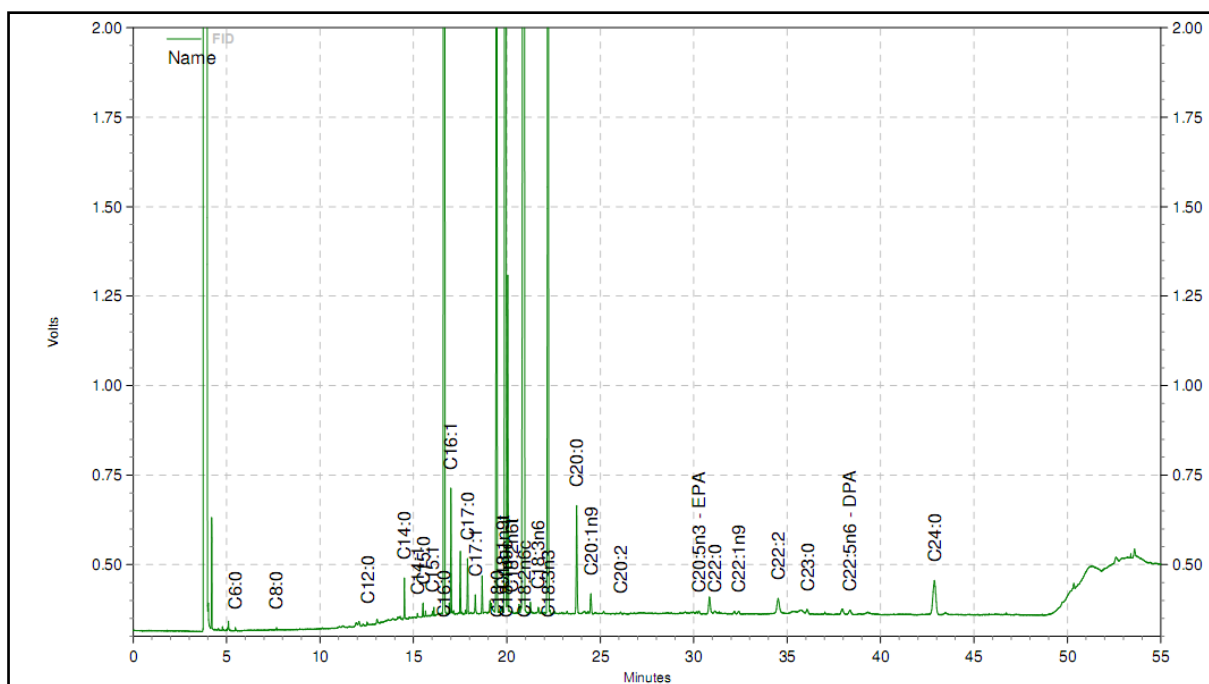


Figura 13 – Cromatograma da Fração Hexano

Tabela 5 – Relação da Composição de Ácidos Graxos Obtidos na Análise Cromatográfica da Fração Hexano do Broto de Girassol

Ácidos Graxos	Tempo de retenção	% total da área	Quiles et al., 2003
Palmítico	16.64	26,99	7,19
Esteárico	19.45	5,89	4,51
Oléico	19.93	22,54	32,08
Linoléico	20.90	37,84	54,26
Linolênico	22.19	4,79	0,1

O ácido linoléico está presente em maior quantidade tanto na fração hexano do broto de girassol (37,84%), quanto no óleo de girassol (54,26%). A relação n-6:n-3 encontrada para a fração hexano do broto de girassol é de 7,9:1 que é superior ao recomendado, porém é inferior aos valores relacionados às dietas ocidentais.

A elevada concentração dos ácidos graxos essenciais oléico e linoléico em óleos permite a utilização em produtos cosméticos, como cremes, xampus, condicionadores e sabonetes. A elevada quantidade de ácido linoléico contribui na função barreira da pele e ajuda a controlar a perda de água transepidérmica (PEREIRA, 2008).

5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

A fração acetato de etila foi submetida à cromatografia em coluna de sílica utilizando-se como eluente a mistura de solventes hexano/acetato de etila/metanol com um gradiente de 10%. Foram recolhidas 60 frações de aproximadamente 10 ml cada. Após a concentração das mesmas observou-se o aparecimento de cristais amorfos amarelados entre as frações 4 e 6, e isolou-se o composto denominado de AC1 (45mg).

5.3.1 Identificação da Substância AC1

A identificação da substância AC1 foi feita com base nos dados espectrais de IV e RMN de ^1H e de ^{13}C , discutidos a seguir.

No espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 14), o composto AC1 apresentou uma banda de absorção em 3085 cm^{-1} característica da deformação axial das ligações C-H de compostos aromáticos. A banda em 2850 cm^{-1} está associada à deformação axial das ligações C-H de grupos CH_3 e a banda intensa em 1690 cm^{-1} é relativa à deformação axial da ligação C-O do grupo carbonila, em frequência mais baixa que normalmente, devido ao efeito de conjugação com o grupo fenila.

Bandas entre 1300 e 1000 cm^{-1} são relativas ao estiramento de ligações C-O característica de ésteres (BARBOSA, 2007).

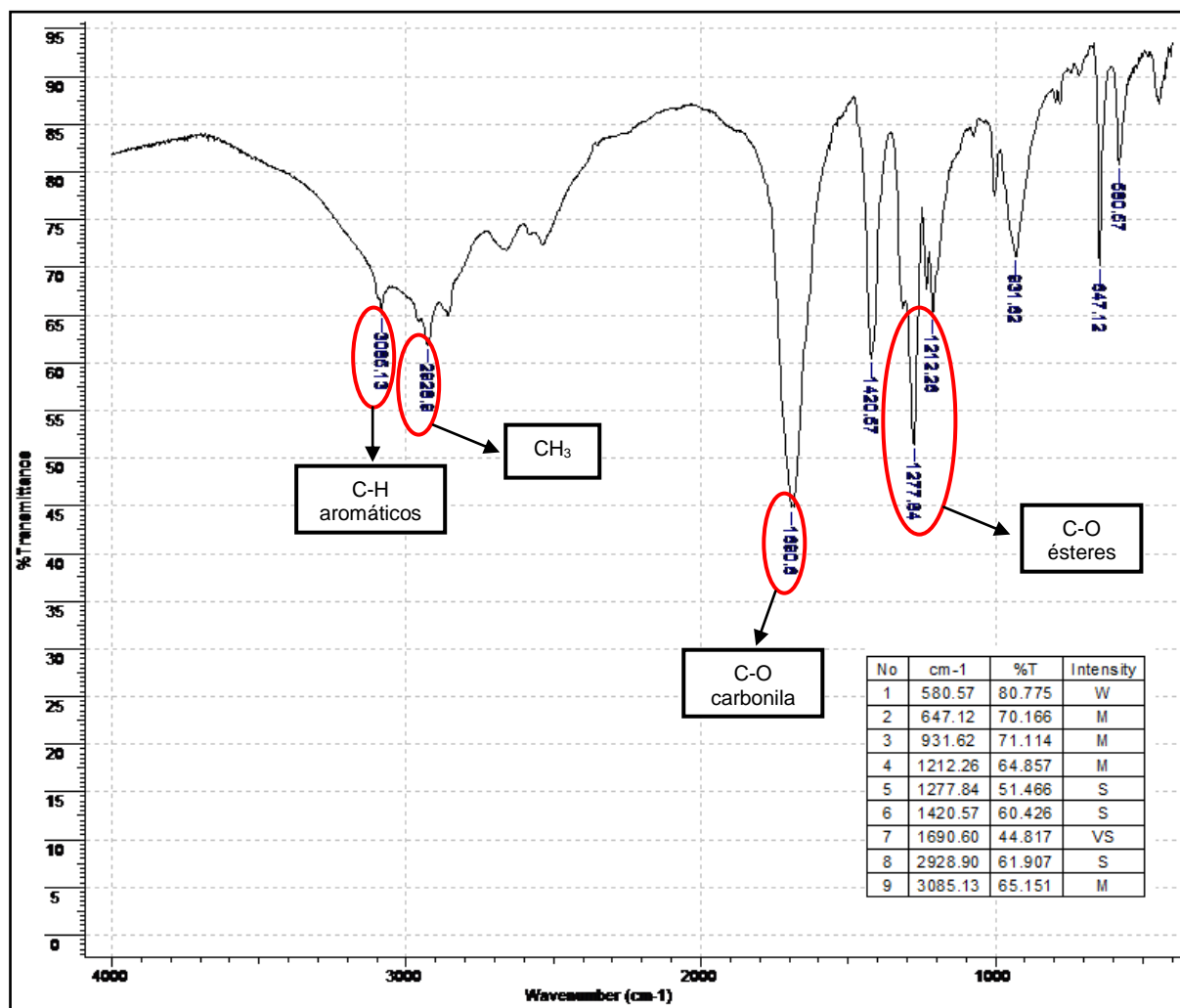


Figura 14 – Espectro no Infravermelho da Substância AC1

Analisando os espectros de RMN de ^{13}C (Figura 15) e do DEPT 135° (Figura 16) podemos observar a presença de somente 4 sinais de carbono. Um grupo

metílico em 29 ppm (CH₃), um sinal relativo à um grupo metínico (CH) em 134 ppm, além de dois outros carbonos quaternários (C), um carbono aromático oxigenado em 166 ppm e outro característico da carboxila de ésteres em 174 ppm.

O espectro de RMN de ¹H (Figura 17) mostrou apenas dois sinais, um singlete em δ 2,41 correspondentes ao grupo metila ligado à carbonila e um singlete em δ 6,62 correspondentes aos hidrogênios aromáticos equivalentes 1/1'/2/2'.

A tabela 6 mostra os dados experimentais obtidos.

Tabela 6 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN-¹³C e RMN- ¹H da Substância AC1

Posição	Experimental		
	¹³ C	DEPT	¹ H
1	174	C q	-
2	166	C q	-
3	134	CH	6,62 s
4	29	CH ₃	2,41 s

Nota: s = singlete

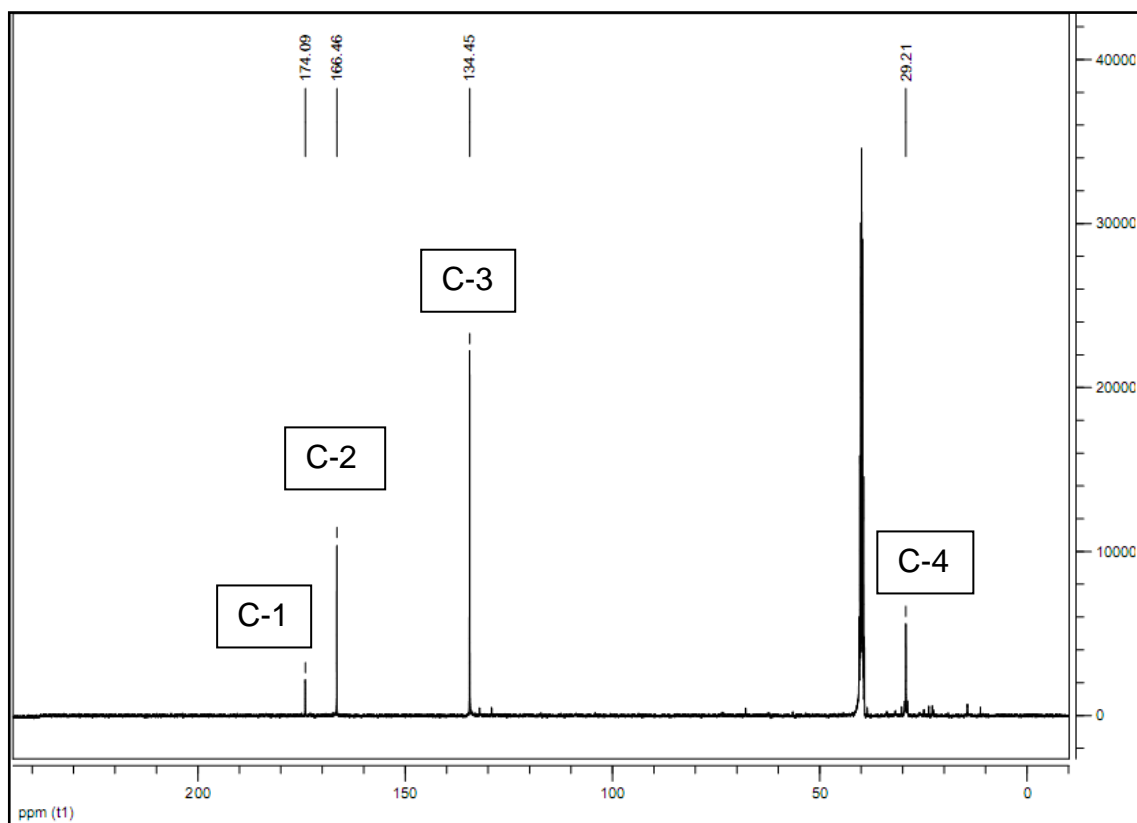


Figura 15 - Espectro de RMN de ^{13}C de AC1 (50 MHz, DMSO-d_6)

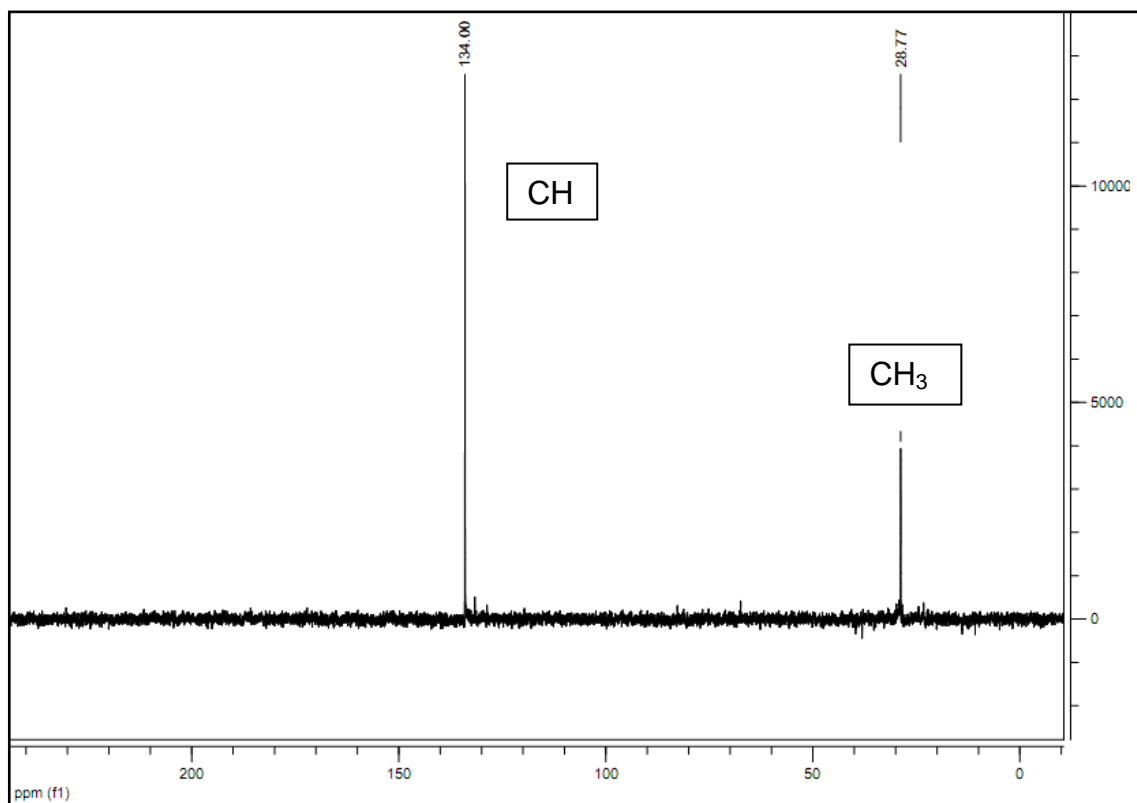


Figura 16 – Espectro DEPT 1350 da Substância AC1(50 MHz, DMSO-d_6)

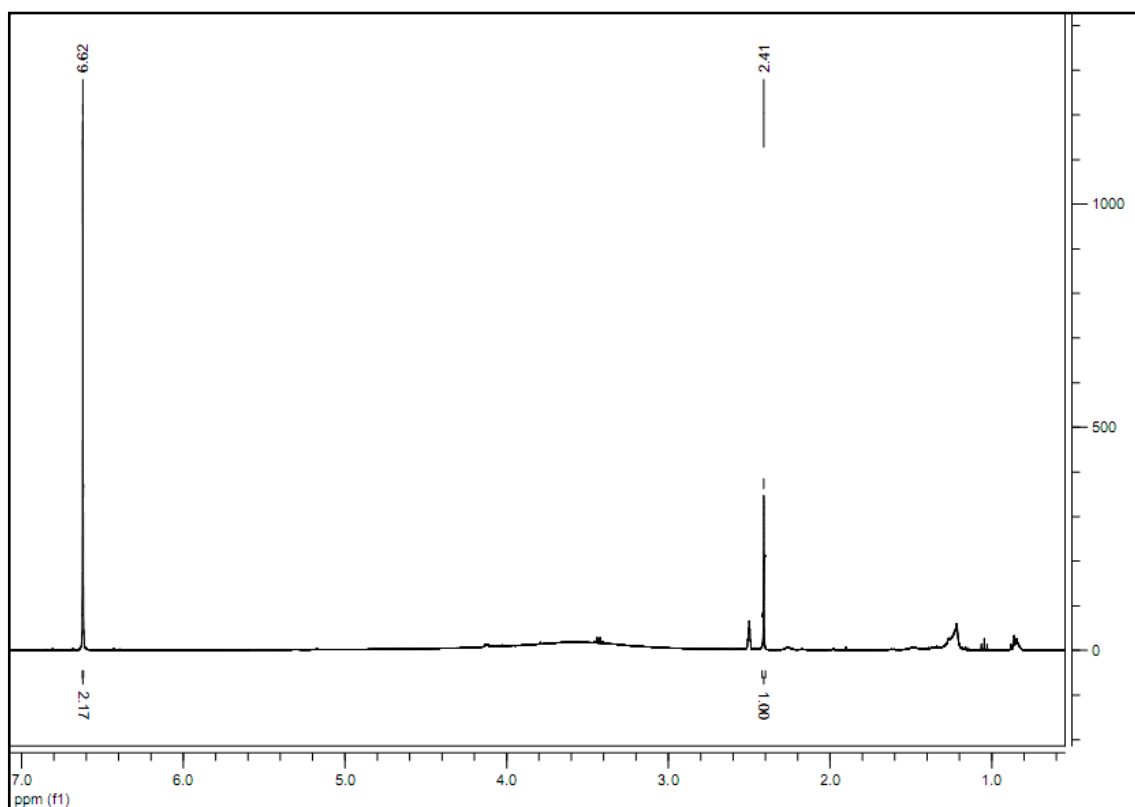


Figura 17 – Espectro de RMN de ^1H da Substância AC1(200 MHz, DMSO-d_6)

De acordo com os dados obtidos, foi possível propor a estrutura de AC1 como sendo o 1,4 diacetato de fenila, cuja estrutura pode ser visualizada na figura 18.

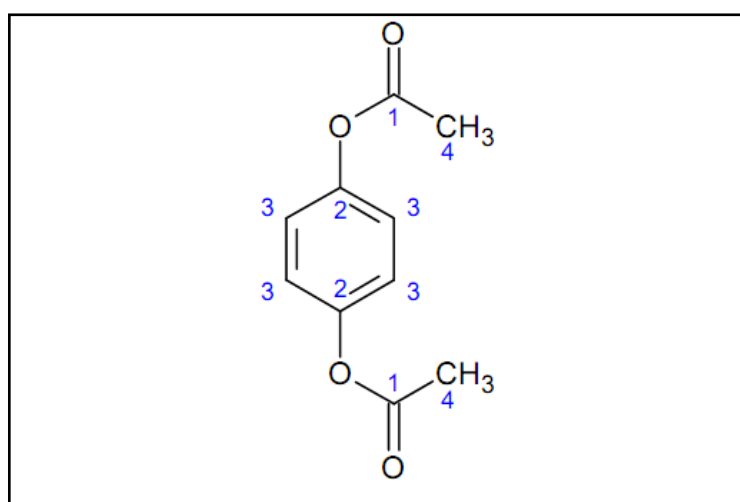


Figura 18 – Estrutura Química do 1,4 Diacetato de Fenila

Até o presente momento esta substância não foi encontrada descrita na literatura como composição do girassol.

A substância AC1 foi primeiramente identificada como sendo o tereftalato de dimetila (Figura 19), anteriormente isolado da fração diclorometano do metabolismo do fungo *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Contudo a comparação com os dados espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H mostraram não se tratar do mesmo composto pois, os valores diferem entre si como pode ser observado na tabela 7. O tereftalato de dimetila, também conhecido como ácido tereftálico, é produzido via síntese química a partir de intermediários petroquímicos (ANDRIOLI, 2008).

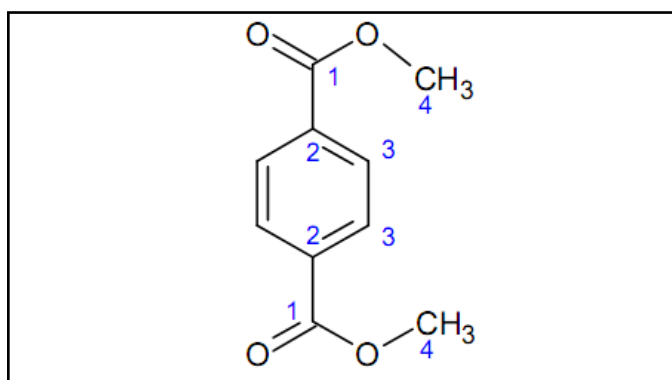


Figura 19 – Estrutura Química do Dimetil Tereftalato

Tabela 7 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ^{13}C e RMN- ^1H da Substância AC1

Posição	Experimental		ANDRIOLI (2008)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	174	-	166	-
2	166	-	134	-
3	134	6,62 s	129	8,1 s
4	29	2,41 s	52	3,95 s

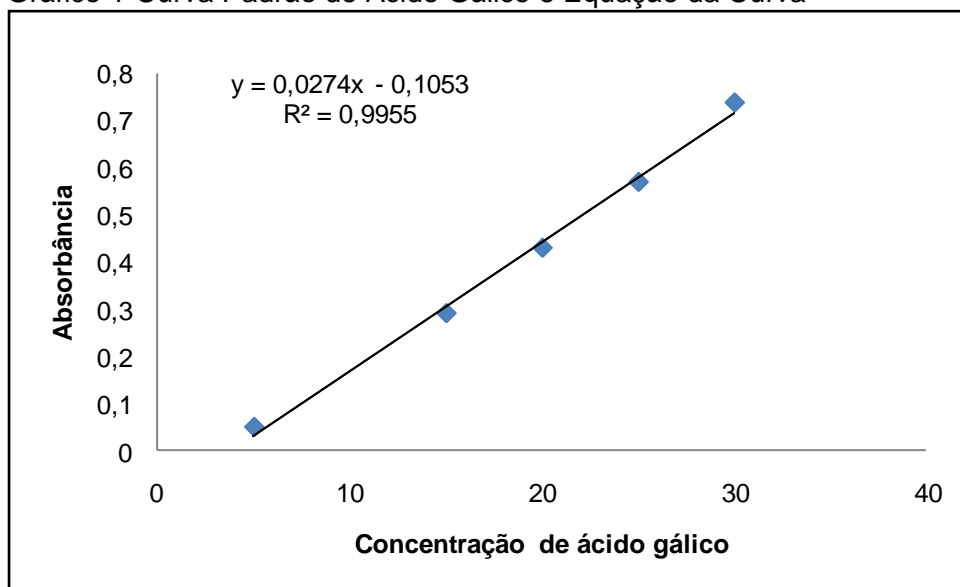
Nota: s = singleto

5.4 DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

Uma curva padrão foi feita a partir de diferentes concentrações de ácido gálico. Utilizando-se a equação da curva padrão, determinou-se a concentração de

compostos fenólicos nas amostras, na qual relaciona-se graficamente a absorbância em função da concentração de polifenóis (Gráfico 1).

Gráfico 1-Curva Padrão de Ácido Gálico e Equação da Curva



Os resultados obtidos demonstram que a fração acetato possui maior concentração de fenólicos totais, seguida pelo extrato bruto e fração clorofórmio. Este resultado se deve provavelmente à presença de flavonóides, taninos e cumarinas em maior concentração na fração acetato de etila. Os resultados estão demonstrados na tabela 8.

Tabela 8 – Absorbância e Concentração de Polifenóis Correspondente à Ácido Gálico

Concentração das amostras	Média das Absorbâncias			Concentração de Polifenóis (%)		
	EB	FA	FC	EB	FA	FC
60	0,132	0,216	0,084	14,45	19,58	11,51
80	0,242	0,301	0,093	15,85	18,55	9,04
100	0,288	0,420	0,113	14,35	19,19	7,99
120	0,320	0,640	0,137	12,93	22,66	7,38

NOTA: EB/FA/FC [extrato bruto][Fração acetato de etila] [Fração clorofórmio]

Os valores encontrados neste estudo foram superiores que os encontrados para o broto de feijão, correspondendo a aproximadamente 1000mg% (LIMA *et al.*, 2004). Isto ocorre pelo fato de que o extrato e as frações estão concentrados.

Considerando a importância dos compostos fenólicos em alimentos, e que, o broto de girassol está sendo incluído na alimentação, esta avaliação é importante, pois a presença de compostos fenólicos está relacionada com a capacidade antioxidante de vários vegetais, e aos efeitos protetores que estes proporcionam à saúde.

5.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.5.1 Atividade Alelopática

5.5.1.1 Avaliação da germinação

Para a avaliação da germinação foi utilizado o teste estatístico de Scott-Knott para comparar os índices de velocidade de germinação (IVG) de cada amostra. Os resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Teste de Scott-Knott para o Índice de Velocidade de Germinação das Sementes de *Lactuca sativa*

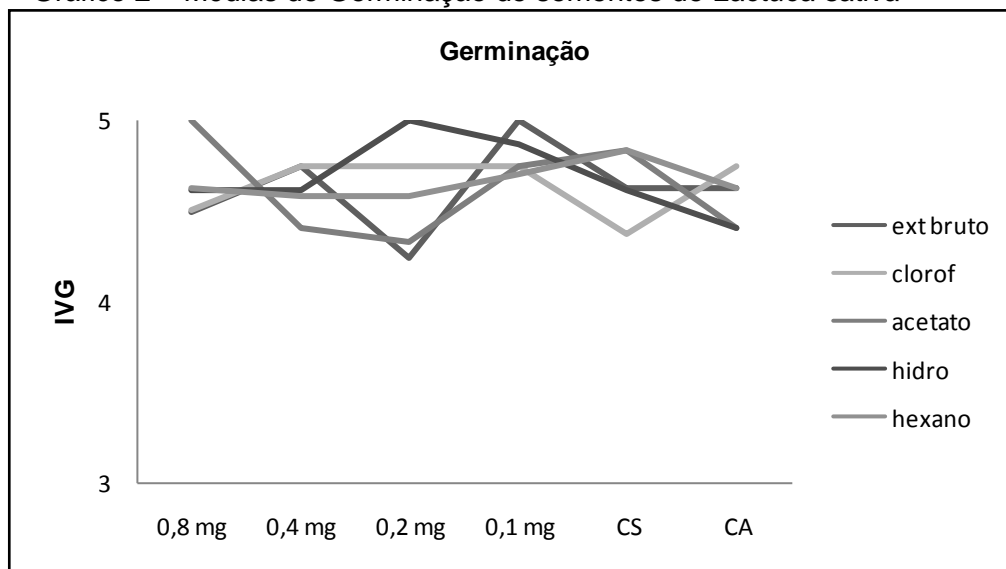
Amostra	Concentração				Controle	Controle
	0,8 mg	0,4 mg	0,2 mg	0,1 mg	Solvente	Água
Extrato Bruto	4,49 a1	4,75 a1	4,24 a1	5,00 a1	4,62 a1	4,62 a1
Fração Clorofórmio	4,50 a1	4,75 a1	4,75 a1	4,75 a1	4,37 a1	4,75 a1
Fração Acetato	5,00 a1	4,41 a1	4,33 a1	4,75 a1	4,83 a1	4,41 a1
Fração Hidroalcoólica	4,62 a1	4,62 a1	5,00 a1	4,87 a1	4,62 a1	4,41 a1
Fração Hexano	4,62 a1	4,58 a1	4,58 a1	4,70 a1	4,83 a1	4,62 a1

*Amostras seguidas da mesma numeração não diferem estatisticamente

As amostras não demonstraram influência sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa*, pois não diferem estatisticamente.

A ausência de variação pode ser visualizada no gráfico 2.

Gráfico 2 – Médias de Germinação de sementes de *Lactuca sativa*



5.5.1.2 Avaliação do crescimento

Para a análise da influência das amostras sobre o crescimento da radícula e hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa*, utilizou-se o teste estatístico de Scott-Knott. Os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Teste de Scott-Knott para a Avaliação do Crescimento da Radícula e Hipocótilo das Sementes de *Lactuca sativa*

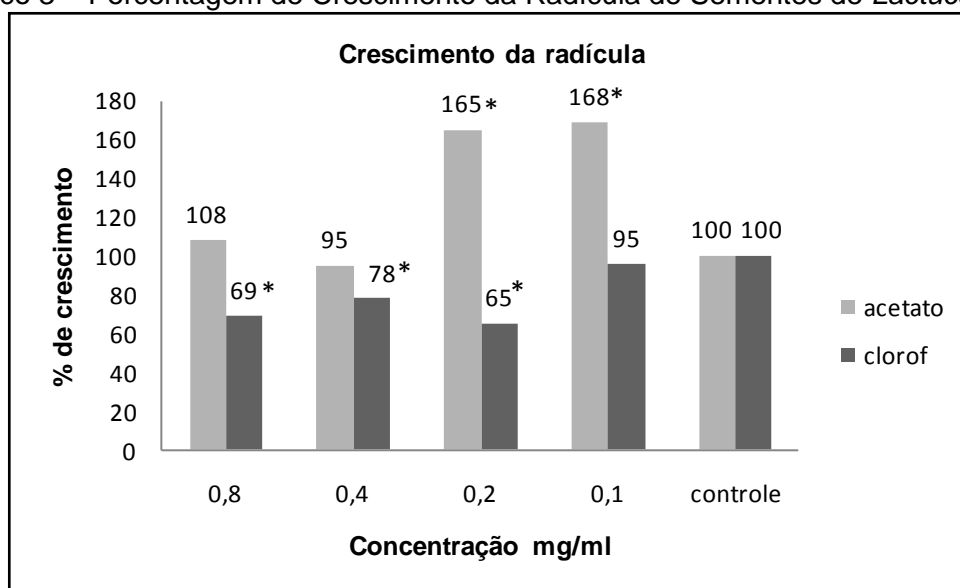
Tratamento	Repetição	Radícula Média (mm)					Hipocótilo Média (mm)				
		EB	FC	FH	FA	FHA	EB	FC	FH	FA	FHA
0,8 mg	1	14,4 a1	14,0 a1	19,6 a1	18,4 a1	14,2 a1	31,4 a1	26,8 a1	25,6 a1	32,8 a1	22,4 a1
	2	12,0 a1	11,8 a1	17,0 a1	12,6 a1	15,4 a1	25,6 a1	24,0 a1	23,2 a1	33,4 a1	27,8 a1
	3	15,4 a1	12,6 a1	13,8 a1	18,8 a1	16,4 a1	29,4 a1	22,0 a1	20,6 a1	32,2 a1	29,6 a1
	4	15,0 a1	16,8 a1	21,0 a1	21,6 a2	21,2 a1	29,8 a1	29,4 a1	21,8 a1	22,6 a1	30,4 a1
0,4	1	16,8 a1	17,0 a1	18,6 a1	13,0 a1	16,6 a1	27,8 a1	27,6 a1	21,2 a1	33,8 a1	29,0 a1
	2	13,8 a1	13,6 a1	25,4 a1	14,4 a1	19,4 a1	25,0 a1	25,4 a1	25,0 a1	25,2 a1	32,8 a1
	3	20,6 a1	16,0 a1	24,6 a1	14,6 a1	21,4 a1	32,2 a1	21,2 a1	25,4 a1	28,8 a1	35,2 a1
	4	17,0 a1	21,6 a2	21,0 a1	16,6 a1	23,8 a1	31,4 a1	27,8 a1	23,2 a1	35,2 a1	35,2 a1
0,2	1	15,6 a1	11,0 a1	18,6 a1	24,8 a2	12,2 a1	22,8 a1	20,0 a1	21,2 a1	30,2 a1	19,0 a1
	2	13,2 a1	14,8 a1	21,8 a1	26,4 a2	19,8 a1	25,0 a1	29,8 a1	24,6 a1	28,6 a1	29,0 a1
	3	15,0 a1	14,4 a1	18,4 a1	24,0 a2	20,6 a1	25,6 a1	28,2 a1	23,2 a1	27,0 a1	32,8 a1
	4	18,2 a1	11,8 a1	21,0 a1	26,2 a2	22,6 a1	31,8 a1	27,8 a1	21,2 a1	23,0 a1	33,4 a1
0,1	1	23,2 a1	18,4 a2	19,0 a1	28,4 a2	15,6 a1	31,4 a1	28,0 a1	20,6 a1	21,8 a1	20,2 a1
	2	19,4 a1	20,6 a2	22,8 a1	23,6 a2	17,6 a1	30,6 a1	27,8 a1	27,8 a1	25,2 a1	21,4 a1
	3	23,8 a1	18,2 a2	21,8 a1	25,8 a2	20,6 a1	30,6 a1	26,0 a1	18,6 a1	26,4 a1	23,6 a1
	4	20,6 a1	15,6 a1	18,8 a1	18,6 a1	21,8 a1	25,8 a1	23,2 a1	20,6 a1	28,2 a1	25,4 a1
Controle Água	1	10,6 a1	23,6 a2	15,2 a1	21,0 a2	9,6 a1	14,4 a1	28,0 a1	23,6 a1	17,4 a1	17,4 a1
	2	14,6 a1	19,6 a2	20,4 a1	9,6 a1	16,8 a1	21,6 a1	27,2 a1	30,0 a1	20,2 a1	22,2 a1
	3	12,6 a1	18,8 a2	14,0 a1	19,8 a1	19,8 a1	24,6 a1	28,0 a1	22,0 a1	24,5 a1	23,4 a1
	4	17,0 a1	18,0 a2	14,8 a1	16,8 a1	21,0 a1	24,6 a1	29,8 a1	21,6 a1	27,0 a1	27,0 a1
Controle Solvente	1	19,2 a1	14,0 a1	19,4 a1	13,2 a1	11,2 a1	28,2 a1	16,6 a1	23,2 a1	24,2 a1	24,2 a1
	2	17,4 a1	19,8 a2	20,8 a1	13,0 a1	13,0 a1	30,8 a1	26,2 a1	17,0 a1	27,0 a1	27,0 a1
	3	21,2 a1	19,8 a2	22,0 a1	11,2 a1	13,2 a1	24,8 a1	24,6 a1	28,0 a1	29,2 a1	29,2 a1
	4	20,6 a1	25,8 a2	22,2 a1	18,4 a1	18,4 a1	30,0 a1	29,4 a1	23,8 a1	29,6 a1	29,6 a1

*Médias seguidas pelo mesmo número na mesma coluna não diferem estatisticamente.

NOTA: EB/FC/FH/FA/FHA [extrato bruto] [Fração hexano][Fração acetato de etila] [Fração hidroalcoólica] [Fração clorofórmio] [vitamina C] [rutina]

Observa-se que a fração clorofórmio demonstrou influência sobre o crescimento da radícula das sementes de *Lactuca sativa* nas concentrações de 0,8, 0,4 e 0,2 mg. Comparando com o controle a fração clorofórmio inibiu o crescimento da radícula e não teve influência sobre o crescimento do hipocótilo. Já para a fração acetato houve influência positiva sobre o crescimento da radícula nas concentrações de 0,2 e 0,1 mg. O extrato bruto, a fração hexano e a fração hidroalcoólica não demonstraram influência sobre o crescimento da radícula e do hipocótilo.

A influência das frações clorofórmio e acetato podem ser observadas no gráfico 3.

Gráfico 3 – Porcentagem de Crescimento da Radícula de Sementes de *Lactuca sativa*

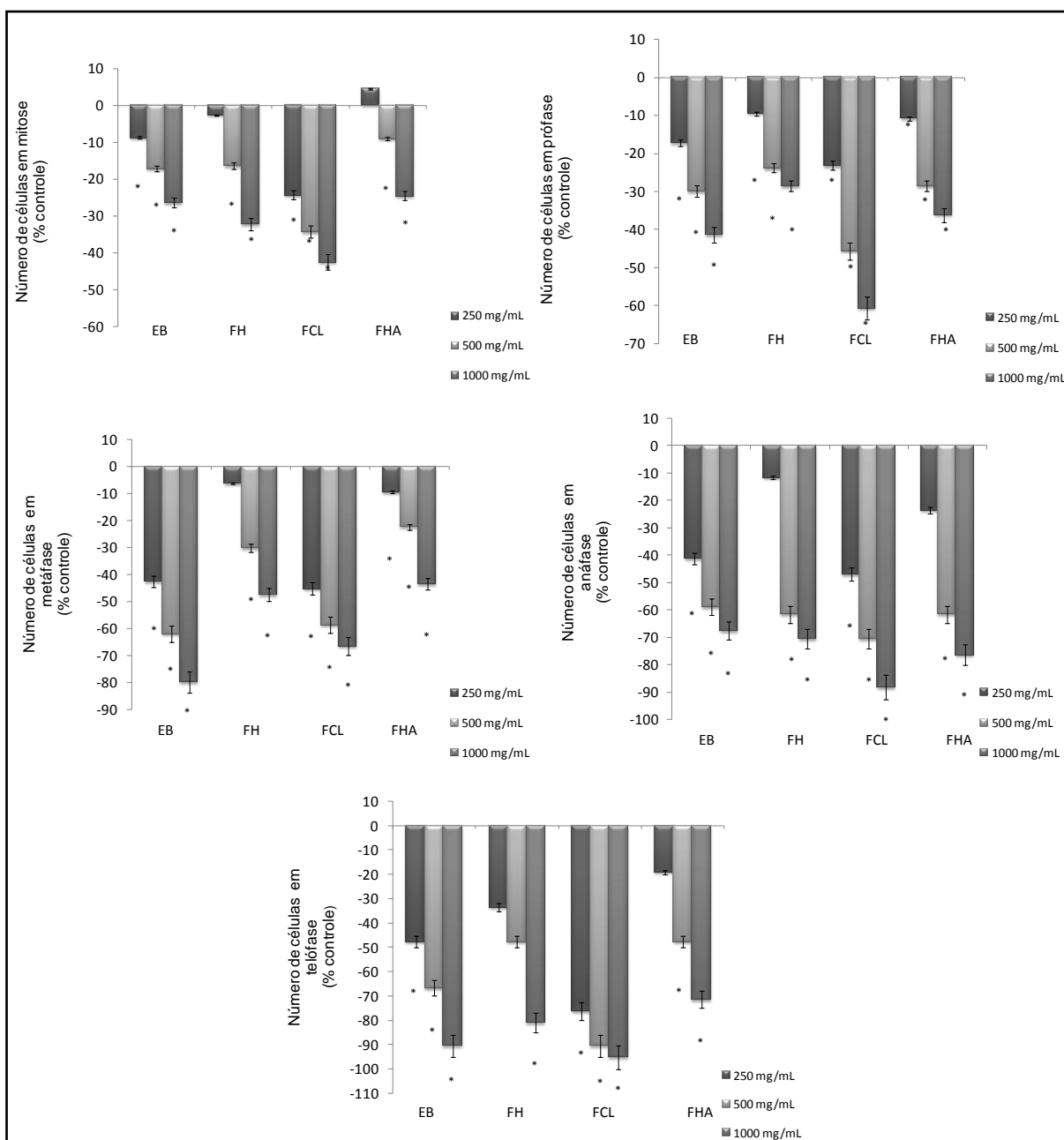
Em relação ao controle, a fração clorofórmio apresentou uma inibição no crescimento da radícula de 31% na concentração de 0,8 mg, 22% em 0,4 mg e 35% em 0,2 mg. Já a fração acetato estimulou o crescimento da radícula de 65% e 68% nas concentrações de 0,2 e 0,1 mg.

Geralmente os efeitos causados em dicotiledôneas pelos sesquiterpenos do girassol são inibitórios. O resultado encontrado neste trabalho corrobora com dados obtidos por Macías *et al.* (2000), onde foi testada a atividade alelopática de soluções aquosas contendo sesquiterpenos isolados de folhas de girassol, e dentre as soluções testadas duas contendo os compostos Heliannoul E e G estimularam, e duas contendo os compostos Heliannoul F e K inibiram o crescimento da radícula de *Lactuca sativa*.

A atividade fitotóxica sugere que os sesquiterpenos podem estar envolvidos na defesa do girassol contra espécies dicotiledôneas e poderiam ser usados como modelos naturais de herbicidas (MACÍAS *et al.* 2000).

5.5.1.3 Análise do índice mitótico

Os resultados das observações citológicas em células meristemáticas das raízes de plântulas de *Lactuca sativa*, tratadas com diferentes concentrações do extrato bruto e frações do broto de girassol, são apresentadas na figura 20.



*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey

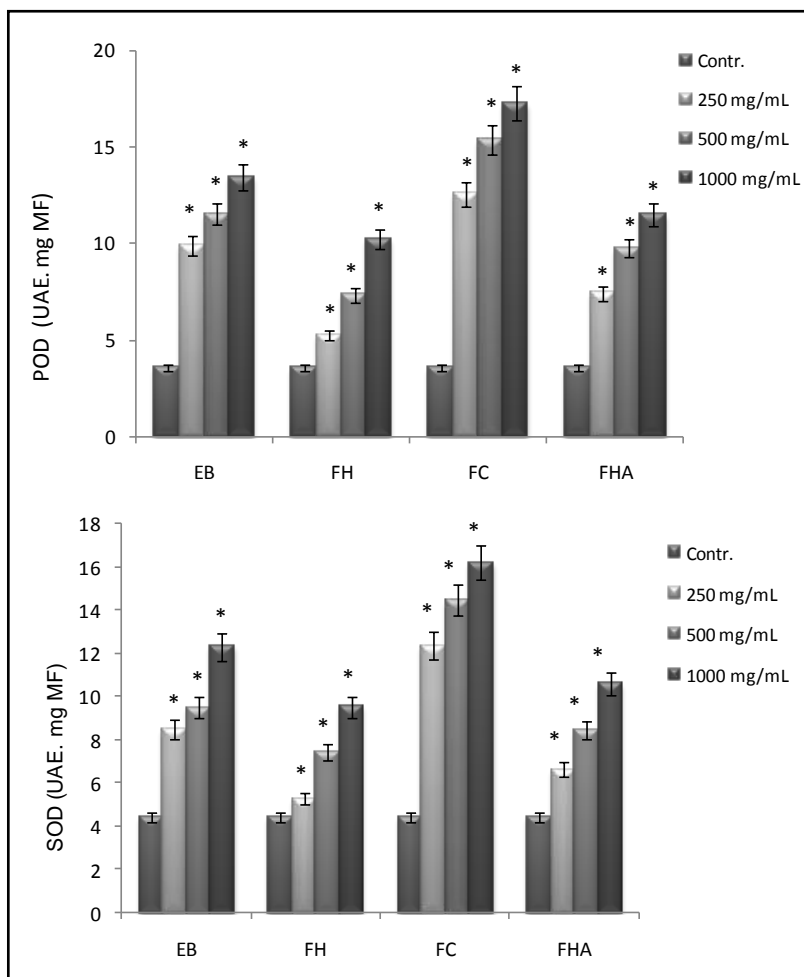
Figura 20 – Índice Mitótico em Células Meristemáticas de Raízes de Plântulas de Alface, Expostas a Diferentes Concentrações do Extrato Bruto, das Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle

Com o aumento da concentração das amostras houve uma redução no processo de divisão das células, principalmente na concentração de 1000 mg/mL para todas as amostras avaliadas, sendo que nesta concentração a FC apresentou o maior efeito depressivo, em que o índice mitótico foi inibido em 42% quando comparada ao controle. Comparando-se as frequências das diferentes fases da mitose dentro de cada tratamento (Figura 20), observou-se uma maior frequência de células em prófase e menor frequência nas outras fases subsequentes. Com o aumento das concentrações, houve uma drástica redução no índice mitótico, em consequência principalmente da ausência de telófase.

Segundo Mano (2006), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas. Os efeitos observados neste trabalho indicam que o EB e frações avaliadas, causam interferência na divisão, afetando o comprimento final das plântulas avaliadas. A redução do crescimento da espécie-alvo pode estar associada à uma forte inibição da mitose ou/e rompimento da estrutura das organelas, causando redução no número de células.

Essa redução no processo de divisão celular pode ser consequência da peroxidação das membranas de lipídeos ou proteínas (SONG, ZHENG e CHUN, 1996), resultando em mudanças na permeabilidade das membranas, destruição dos cloroplastos, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático. Esses processos fisiológicos anormais contribuem para a redução do crescimento das plantas, o que corrobora com resultados obtidos por Kupidłowska *et al.* (2006), que observaram uma supressão da mobilização de lipídeos em sementes de mostarda tratadas com extrato de girassol.

5.5.1.4 Análise da atividade da peroxidase, catalase, superóxido dismutase, polifenoloxidase, α -amilase e proteínas totais

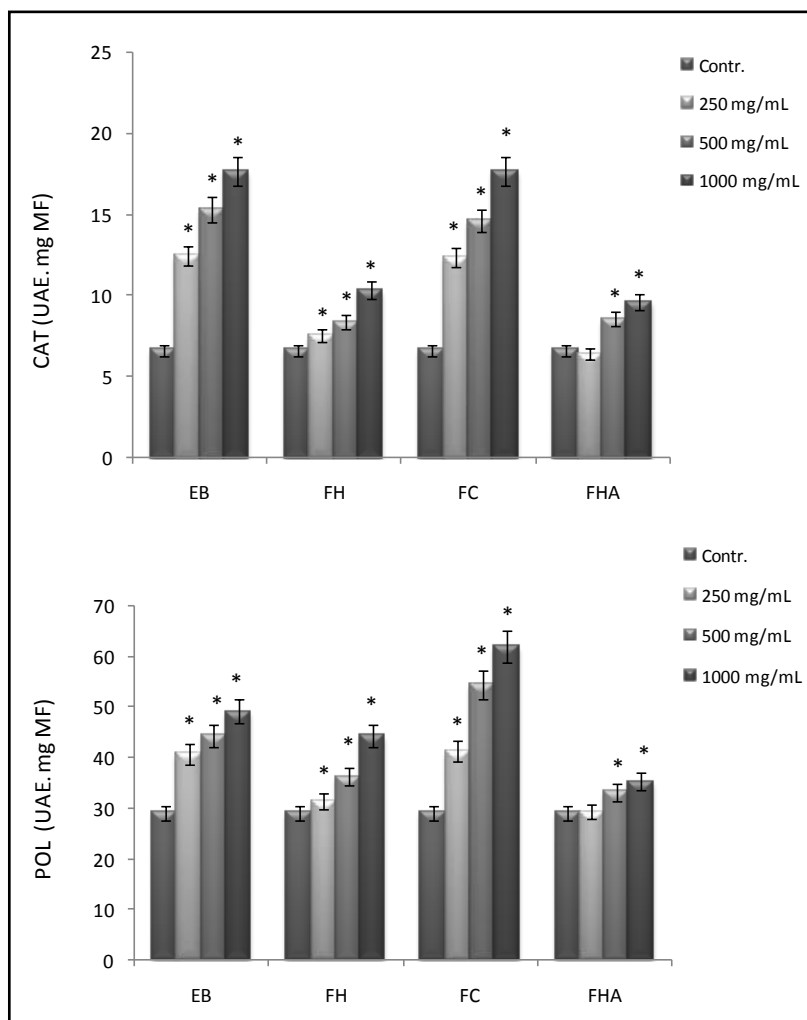


*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey

Figura 21 – Atividade da Peroxidase e Superóxido Dismutase, em Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle

A atividade das enzimas peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) foi acentuada em todas as concentrações testadas do extrato bruto e das frações. Observou-se um efeito dose-dependente entre as concentrações avaliadas. As plântulas de alface foram mais sensíveis ao EB e a FC, em todas as concentrações,

sendo que os maiores efeitos fitotóxicos ocorreram na concentração de 1000 mg/mL.



*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey

Figura 22 – Atividade da Catalase, Polifenoloxidase em Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle

Já a atividade das enzimas catalase (CAT) e polifenoloxidase (POL) foi acentuada principalmente para o EB, FC, FH e FHA não sendo significativo apenas para a concentração de 250 mg/mL da FHA.

Com o aumento das espécies reativas de oxigênio, as plantas aumentam a produção de SOD e CAT como defesa, embora tenha sido relatado que alguns

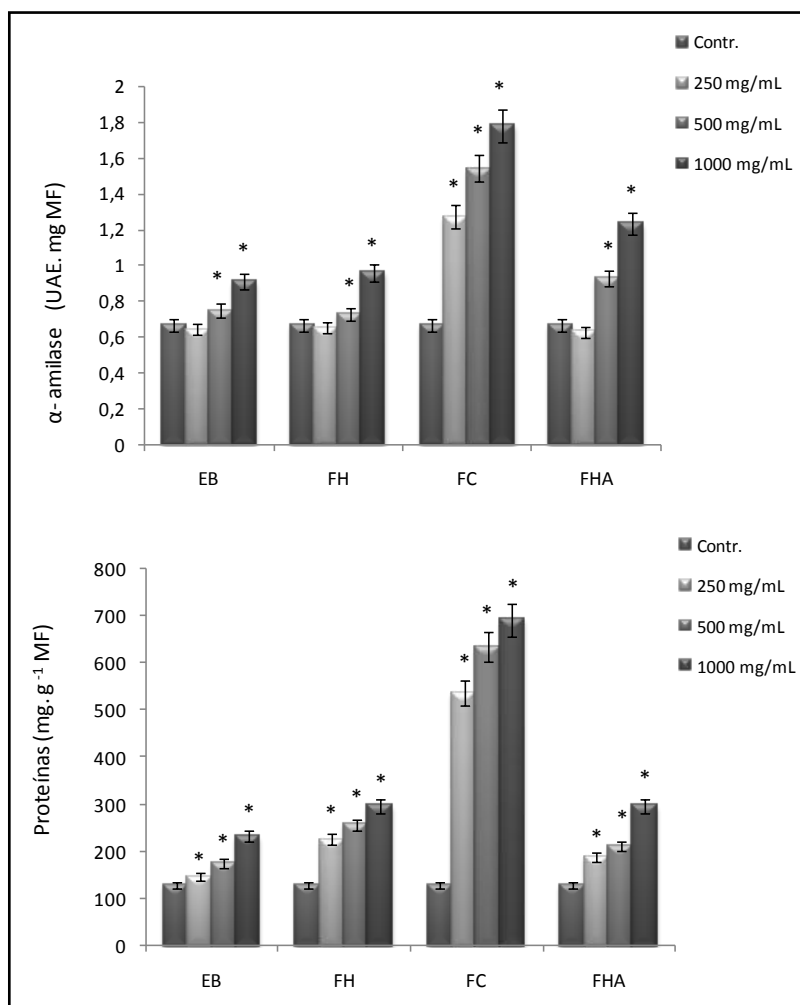
aleloquímicos podem reduzir a atividade dessas enzimas (WEIR, PARK, VIVANCO, 2004).

Enzimas antioxidantes como a catalase aumentam sua atividade minimizando os efeitos do estresse oxidativo por meio da remoção do peróxido de hidrogênio. Já a enzima superóxido dismutase protege as células contra a toxicidade do oxigênio pela varredura do radical superóxido, sendo assim um componente chave no processo de detoxificação de radicais livres nas células (ODÉN, KARLSSON, EINARSSON, 1992).

A ação dos aleloquímicos está envolvida na inibição e modificação do crescimento ou desenvolvimento das plantas. Os aleloquímicos podem ser seletivos em suas ações e as plantas podem ser seletivas em suas resposta, motivo pelo qual torna-se difícil esclarecer o modo de ação destes compostos (SEIGLER, 1996).

O aumento da atividade das peroxidases está relacionada com a capacidade de adaptação das plantas, principalmente em processos de crescimento, diferenciação celular e mudanças morfogénéticas causadas em resposta ao estresse físico, químico ou biológico. A atividade dessa enzima pode ser considerada um marcador bioquímico de estresse (ANDRADE *et al.*, 2010).

A enzima polifenoloxidase está envolvida em mecanismos de defesa das plantas, sendo geralmente encontrada em maior atividade em tecidos infectados. A importância da atividade desta enzima na resistência a doenças é provavelmente devido à propriedade de oxidar compostos fenólicos, resultando em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação, e assim em maior grau de resistência à infecção (CAMPOS *et al.*, 2004).



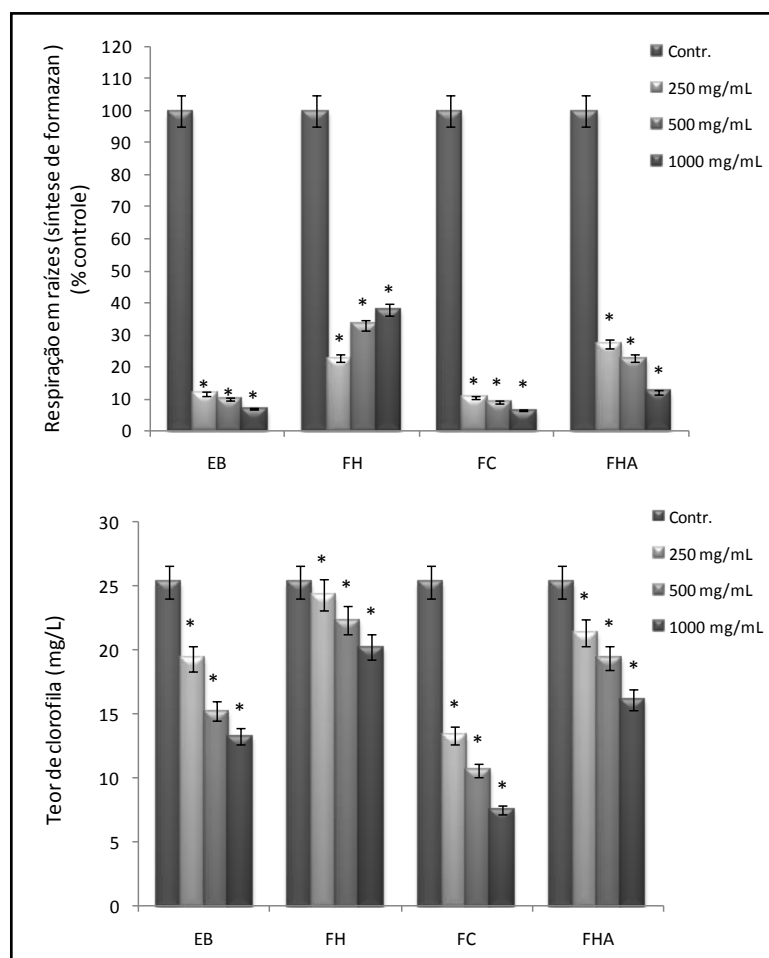
*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey

Figura 23 – Atividade da α -amilase e Proteínas Totais em Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Frações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle

A atividade da alfa amilase aumentou significativamente em todas as concentrações ensaiadas da FC e, para o EB, FH e FHA o aumento não foi significativo na concentração mais baixa. A alfa amilase é uma enzima hidrolítica responsável pela conversão do amido em açúcares, utilizada especialmente para o crescimento da plântula. O aumento na atividade da alfa amilase também está relacionada à síntese da própria enzima (JACOBSEN, HANSON, CHANDLER, 1986). O aumento da atividade da alfa amilase indicou que no final do experimento, houve gasto energético da plântula, o que pode estar associado ao atraso na germinação e crescimento de *Lactuca sativa*.

Ocorreu um aumento no nível de proteínas totais para todas as amostras testadas, principalmente para a FC e concentrações de 1000 mg/mL. A alteração no conteúdo de proteínas no tecido vegetal pode ser um indicativo da ativação de mecanismos de defesa da planta (VIECELLI, *et al.* 2010). Em geral, as plantas submetidas a algum tipo de estresse biótico ou abiótico apresentam um aumento na síntese de proteínas de defesa. Dentre as famílias de proteínas de defesa mais amplamente difundidas no Reino Vegetal estão as quitinases, glucanases, peroxidases, fenilalanina amônia-liases e inibidores de proteases (SÁNCHEZ *et al.*, 2000).

5.5.1.5 Análise do teor de clorofila e respiração



*A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey

Figura 24 – Teor de Clorofila e Respiração em Raízes de Plântulas de Alface Submetidas ao Extrato Bruto (EB) e as Fações Hexano (FH), Clorofórmio (FC) e Hidroalcoólica (FHA) do Broto de Girassol. Dados Expressos em Percentual em Relação ao Controle

O extrato bruto e as frações provocaram redução tanto no teor de clorofila como na atividade respiratória das plântulas de *Lactuca sativa*. O extrato e as frações causaram uma redução na atividade respiratória de 62 a 94%, sendo que o EB e a FC foram as amostras mais ativas. No teor de clorofila todas as amostras causaram redução significativa e a FC foi a mais expressiva, reduzindo em até 71% o teor de clorofila.

A inibição da fotossíntese pode ocorrer devido à presença de aleloquímicos como os ácidos fenólicos, as cumarinas, os polifenóis e os flavonoides, pois os mesmos provocam mudanças no conteúdo de clorofila das plantas e na atividade respiratória (BORELLA *et al.*, 2009).

5.5.2 Atividade Antioxidante

5.5.2.1 Ensaio pelo Método da Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

Os resultados encontrados na avaliação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio estão apresentados na tabela 11. A atividade antioxidante de cada amostra foi calculada em relação à vitamina C e rutina consideradas 100%, por serem substâncias de potente ação antioxidante.

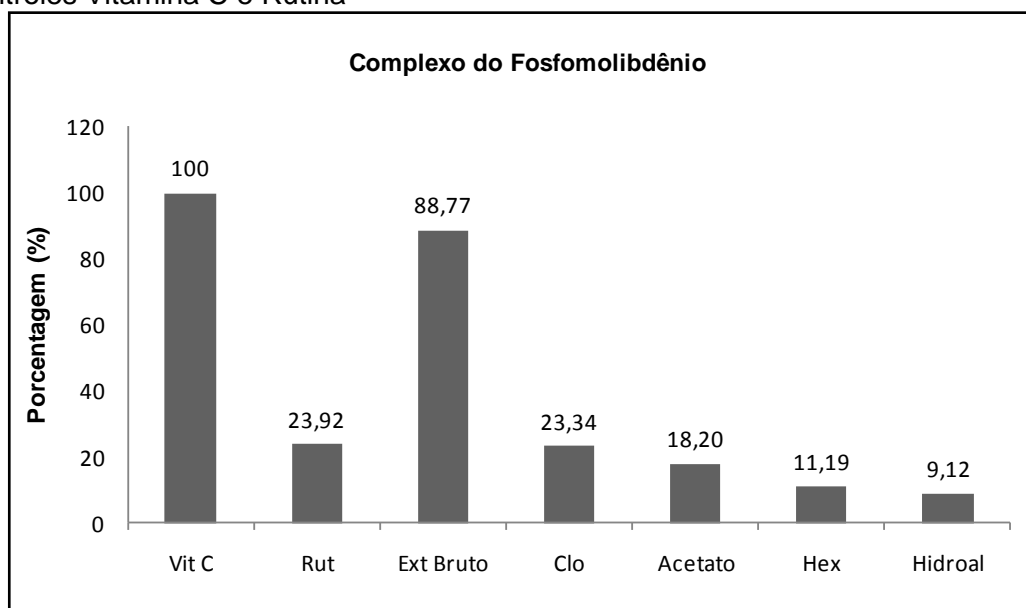
Tabela 11 – Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo Fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante Em relação à rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação à vitamina C (%)
Extrato Bruto	371,05	88,76
Fração Clorofórmio	97,57	23,34
Fração Acetato de Etila	76,08	18,02
Fração Hexano	46,75	11,18
Fração Hidroalcoólica	38,14	9,12

Conclui-se que o extrato e as frações testadas apresentaram atividade antioxidante por este método. Comparando os resultados obtidos com o padrão vitamina C observa-se que o extrato bruto apresentou 88% de atividade antioxidante, um resultado expressivo. Quando comparada à rutina a fração clorofórmio demonstrou atividade semelhante e, a fração acetato mostrou uma atividade de 76%. As frações hexano e hidroalcoólica demonstraram uma atividade baixa em relação às demais chegando próximo a 10% de atividade da vitamina C, portanto podem ser consideradas menos ativas.

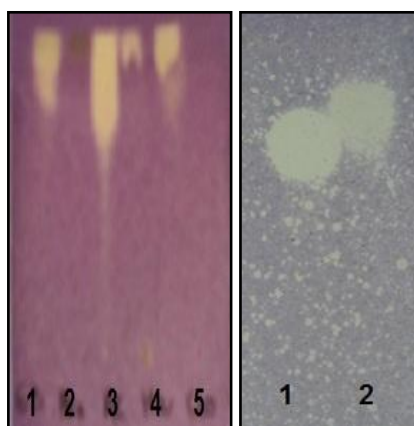
Os resultados também podem ser observados no gráfico 4.

Gráfico 4 – Porcentagem de Inibição do Complexo Fosfomolibdênio em relação aos controles Vitamina C e Rutina



5.5.2.2 Ensaio qualitativo pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

Este ensaio possibilita a visualização de substâncias com potencial antioxidante. O DPPH quando aplicado em placa cromatográfica adquire coloração amarelo ouro, característica em presença de substâncias com atividade antioxidante (CONFORTI *et al.* 2002).



NOTA: Ponto 1/2/3/4/5/1/2 [extrato bruto] [hexano]
[acetato de etila] [hidroalcoólica] [clorofórmio] [vitamina C] [rutina]

Figura 25 – Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH

De acordo com a figura 25, observa-se a presença de substâncias com capacidade antioxidante no extrato bruto, na fração acetato de etila e na fração clorofórmio, sendo assim foi realizada a quantificação destes pela redução do DPPH. Já a fração hexano não apresentou a coloração amarela, e a fração hidroalcoólica apresentou uma coloração fraca, não apresentando dessa forma um potencial antioxidante, portanto não foi realizada a quantificação destas frações pela redução do radical DPPH.

5.5.2.3 Ensaio quantitativo pela Redução do Radical DPPH

Para as amostras testadas foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH pela determinação da concentração da amostra necessária para reduzir 50% da

concentração inicial de DPPH, feita por regressão linear. Os resultados foram comparados com os padrões de vitamina C e rutina. Os gráficos 5 a 9 apresentam as retas médias obtidas para a vitamina C, rutina, fração acetato de etila, extrato bruto e fração clorofórmio respectivamente.

Gráfico 5 – Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH

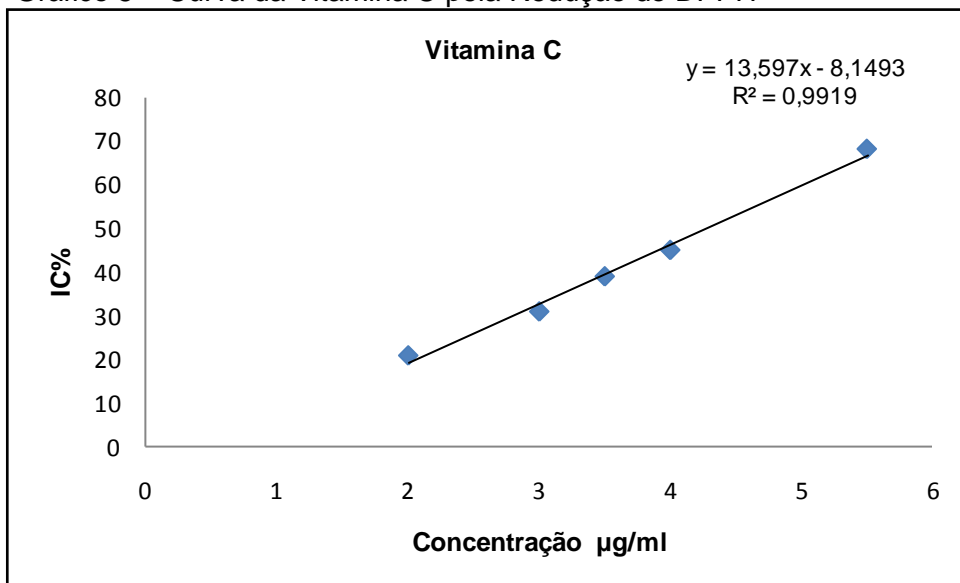


Gráfico 6 – Curva da Rutina pela Redução do DPPH

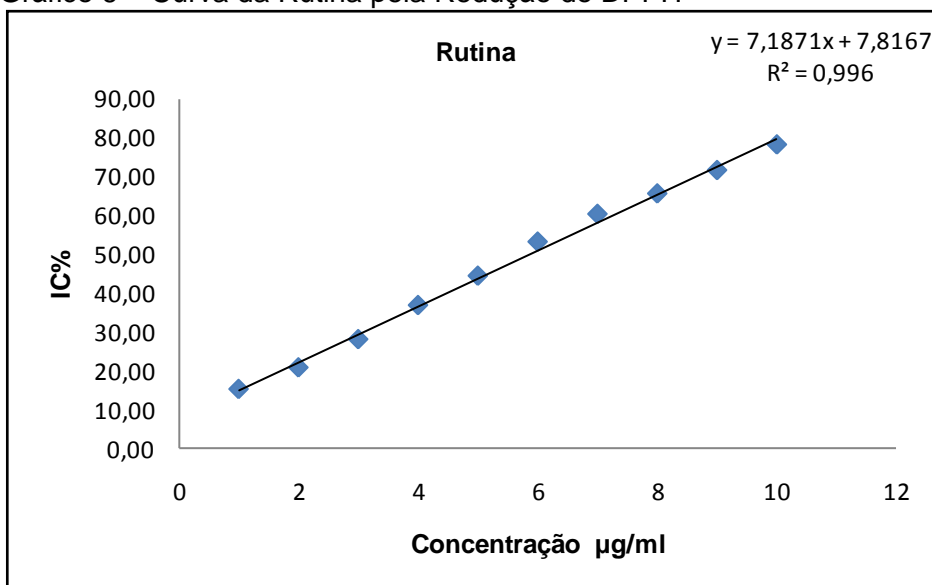


Gráfico 7 – Curva da Fração Acetato de Etila pela Redução do DPPH

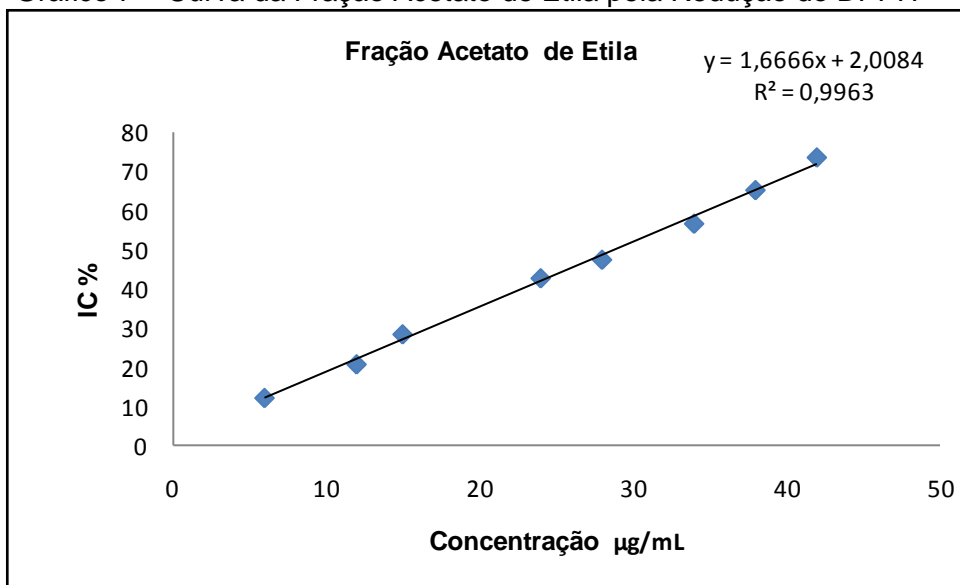


Gráfico 8 – Curva do Extrato Bruto pela Redução do DPPH

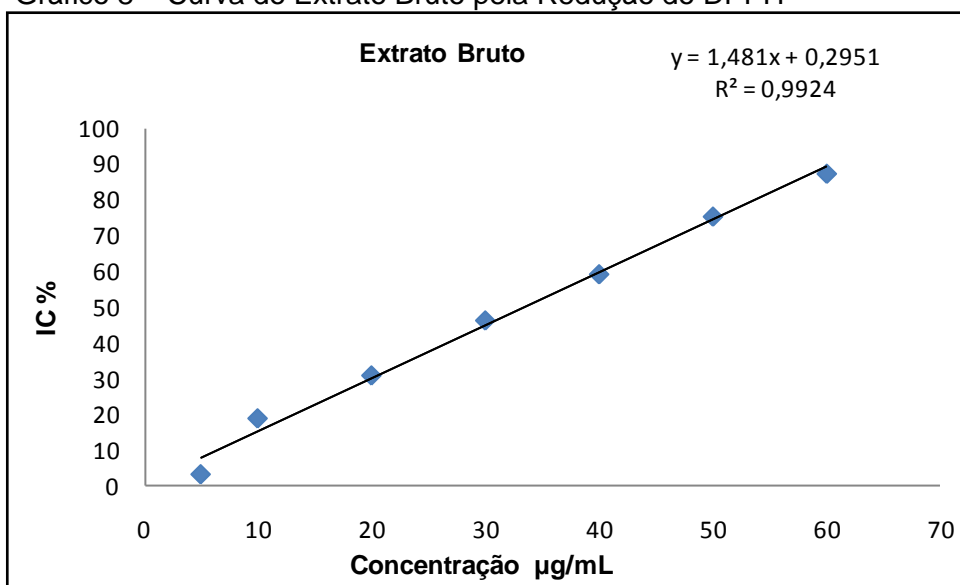
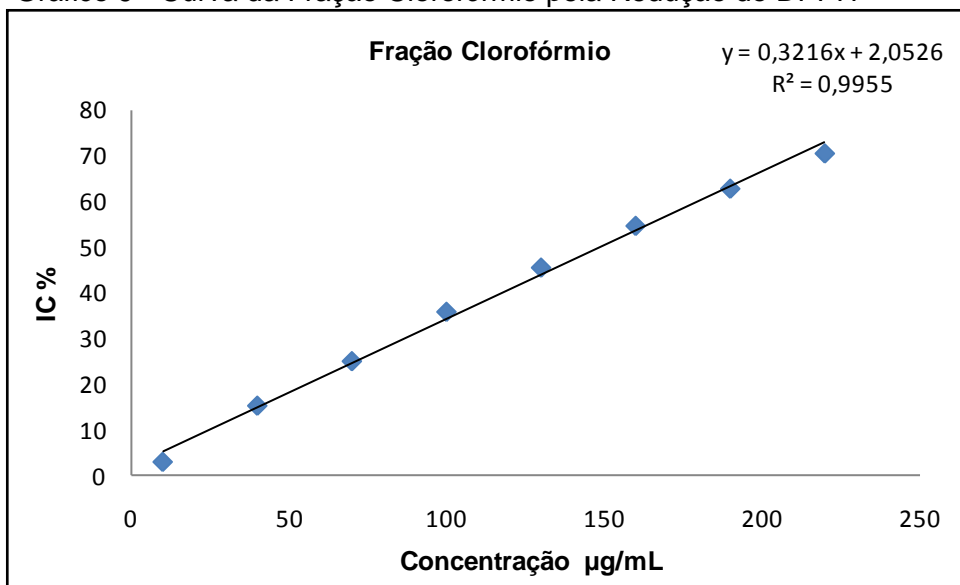


Gráfico 9 - Curva da Fração Clorofórmio pela Redução do DPPH



Os resultados de IC_{50} que correspondem às médias de três repetições \pm desvio padrão são apresentados na tabela 12. Aplicou-se o teste Anova para verificar diferença estatística entre as amostras, e para localização das diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 12 - Resultado de IC_{50} e Teste de Tukey para Redução do DPPH

Amostras	IC_{50} (μg) \pm SD	Teste de Tukey*
Vitamina C	4,30 \pm 0,03	a1
Rutina	5,83 \pm 0,3	a1
Acetato de etila	28,79 \pm 0,48	a2
Exttrato Bruto	33,56 \pm 0,88	a2
Clorofórmio	149,09 \pm 5,57	a3
Hexano	> 500	a4
Hidroalcoólica	> 500	a4

Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

Considerando a análise estatística dos dados verifica-se que todas as amostras analisadas diferem dos padrões de vitamina C e rutina. Das amostras analisadas, as frações acetato de etila e extrato bruto são as que apresentam maior atividade antioxidante, não apresentando diferença estatística entre si. Já a fração clorofórmio apresenta um valor de IC₅₀ superior quando comparada aos padrões e às amostras mais ativas.

As frações hexano e hidroalcoólica apresentaram atividade antioxidante acima de 500 µg/mL, sendo considerada uma atividade fraca.

Liu e colaboradores (2008) verificaram a atividade antioxidante do extrato bruto de brotos de trigo sarraceno e os resultados encontrados indicaram que 1,25 mg/mL do extrato apresentaram alta capacidade antioxidante sobre o radical DPPH. A partir destes resultados conclui-se que o extrato bruto avaliado no presente estudo apresentou capacidade antioxidante superior ao encontrado para o trigo sarraceno, pois apenas 0,03 mg/mL apresentou alta capacidade antioxidante.

Os radicais livres estão relacionados com danos celulares, morte celular, mutação gênica e doenças auto-imune, inflamação, doenças neurológicas, cardiovasculares e câncer. Neste contexto os alimentos com capacidade antioxidante se tornaram um importante tópico de estudo na área da nutrição, pois o consumo adequado de antioxidantes naturais pode proteger as células contra danos oxidativos (LIU *et al.*, 2008).

A atividade antioxidante presente no girassol, pode ser devido à presença de polifenóis como ácido cafeico e ácido clorogênico, pois possuem um alto potencial antioxidante (NADEEN *et al.*, 2010).

5.5.3 Avaliação da Toxicidade Frente à *Artemia salina*

A determinação da toxicidade frente à *Artemia salina* tem sido usada de maneira eficiente para analisar o potencial biológico de extratos de plantas. Vários produtos naturais, especialmente substâncias com atividade antifúngica, antiviral, antibacteriana e tripanosomicida, foram avaliados por este método e demonstraram

uma relação significativa. É também um ensaio rápido, simples, prático e de baixo custo (LEITE *et al.*, 2009).

Neste ensaio foram submetidas amostras do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Os resultados das amostras testadas foram submetidos ao teste estatístico Probitos para o cálculo da DL₅₀. Os resultados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Mortalidade de *Artemia salina* e DL₅₀

Amostra	Mortalidade/Concentração						Intervalo de Confiança (µg/mL) 95%
	C1	C2	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)	DL ₅₀ (µg/mL)	
Fração Hexano	0	0	0	0	0	> 1000	-
Fração Hidroalcoólica	0	0	0	0	0	> 1000	-
Extrato Bruto	0	0	1	4	30	119,03	96,01-147,57
Fração Clorofórmio	0	0	2	3	30	138,76	111,17-173,21
Fração Acetato de Etila	0	0	0	30	30	29,3	25,88-33,18
Sulfato de quinidina	0	0	16	10	18	50,12	35,80-70,16

Nota: DL₅₀ = concentração média letal; C1 = controle 1, tubos tratados c/ água salgada; C2 = controle 2, tubos tratados c/ solvente do teste

A fração acetato de etila possui uma toxicidade significativa frente a este microcrustáceo, pois 29,3 µg/mL foram capazes de provocar a mortalidade de 50% do mesmo, valor que corresponde a 41% do controle positivo sulfato de quinidina. Já o extrato bruto e a fração clorofórmio apresentaram valores semelhantes de DL₅₀ que correspondem a aproximadamente 2,5 vezes o valor do controle positivo.

A concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982) é um valor de DL₅₀ inferior a 1000µg/mL, desta maneira as frações hexano e hidroalcoólica não apresentam toxicidade. Os controles feitos com os solventes e a água salgada não apresentaram influência sobre os resultados, pois nenhuma larva morreu nestas análises.

5.5.4 Atividade Hemolítica

Os resultados para avaliação da atividade hemolítica, em meio de ágar sangue, foram considerados negativos, pois não apresentaram o halo de hemólise ao redor do disco onde as amostras foram aplicadas. Os resultados também foram negativos para os controles com solvente (Figura 26).

Para o extrato bruto, a fração clorofórmio e acetato de etila formou-se um halo escuro ao redor do disco, não caracterizado como hemólise (Figura 26).

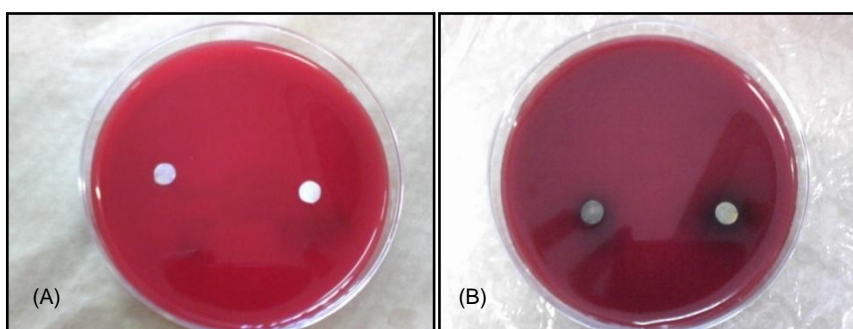


Figura 26 – (A) Ausência do Halo de Hemólise, (B) Presença do Halo Escuro ao Redor das Amostras

Sabe-se que a hemoglobina livre no organismo pode causar sérias complicações a órgãos vitais como rins, coração e fígado (ALVES, 2009). Desta maneira, esse resultado é relevante, pois somado a outros resultados de avaliação de toxicidade pode-se inferir sobre a seguridade quanto ao uso deste alimento.

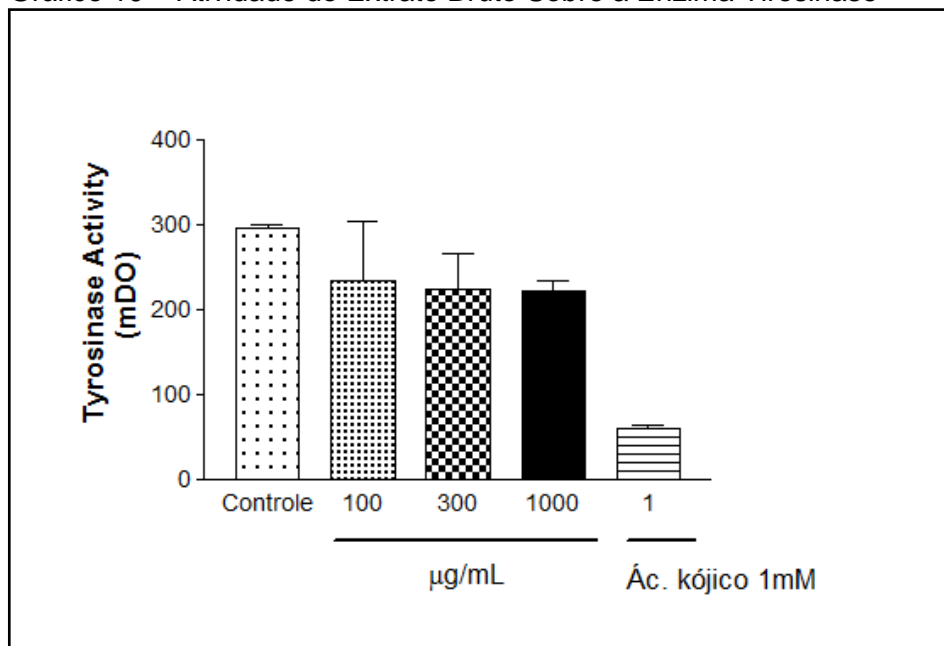
5.5.5 Atividade da Enzima Tirosinase

O excesso de exposição da pele à luz ultravioleta está relacionado com problemas de pigmentação, que estão aumentando conforme a população envelhece. Tanto a hiper quanto a hipopigmentação são tratadas com produtos que contêm substâncias despigmentantes, podendo ser de origem sintética ou natural. Os produtos atualmente utilizados não são totalmente eficazes ou seguros, por este

motivo buscam-se novos agentes com esta ação, principalmente inibidores de enzimas envolvidas na melanogênese, como a tirosinase (MACRINI *et al.*, 2009).

O gráfico 10 mostra o resultado obtido da atividade do extrato bruto sobre a enzima tirosinase.

Gráfico 10 – Atividade do Extrato Bruto Sobre a Enzima Tirosinase



Nas concentrações 100, 300 e 1000 µg/mL avaliadas de extrato bruto, não foi observada interferência sobre a atividade da tirosinase, pois os valores obtidos não foram significativos quando comparados ao controle.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou a importância do estudo de novos alimentos com potencial para serem inseridos no mercado. De acordo com os experimentos realizados para avaliação das atividades propostas neste estudo, conclui-se:

- A avaliação físico-química, realizada pela primeira vez para o broto de girassol, revelou que o mesmo possui um alto teor de água e clorofila, baixo teor de lipídeos, pouca vitamina C e fibras, como outros brotos. É um alimento, que pode ser utilizado como salada ou suco enriquecendo o cardápio do dia-a-dia. Porém é necessária a realização de pesquisas da composição das outras vitaminas e minerais presentes no broto de girassol, assim como a quantificação de clorofila, pois pode ser uma alternativa na produção de sucos de clorofila onde apenas a grama do trigo é utilizada.
- A análise fitoquímica preliminar realizada com o extrato aquoso e alcoólico do broto de girassol apontou a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: cumarinas, esteróis, triterpenos, taninos, catequinas e aminogrupos. A análise de cromatografia gasosa revelou o perfil de ácidos graxos presentes na fração hexano, composta principalmente pelos ácidos oléico, linoléico, palmítico e esteárico.
- Isolou-se, pela primeira vez em plantas, da fração acetato de etila o composto denominado 1,4 diacetato de fenila.
- A fração hexano demonstrou elevada concentração de ácidos graxos essenciais oléico e linoléico. Uma característica importante para a produção de produtos cosméticos, como cremes, xampus, condicionadores e sabonetes.
- A atividade antioxidante foi bem expressiva para o extrato bruto, a fração acetato de etila e clorofórmio, resultados que estão relacionados com a quantidade polifenóis totais que foi alta para estas amostras.

- O ensaio alelopático revelou influência tanto de inibição pela fração clorofórmio quanto estímulo pela fração acetato de etila no crescimento da radícula de *Lactuca sativa*. Todas as amostras inibiram o índice mitótico das células, estimularam a atividade de algumas enzimas antioxidantes e inibiram o teor de clorofila e a atividade respiratória das plântulas de alface, sendo que a atividade da fração clorofórmio foi a mais expressiva.
- Para os ensaios de toxicidade, o extrato bruto, a fração clorofórmio e acetato de etila demonstraram-se tóxicos para o microcrustáceo *Artemia salina* com valores próximos ao do controle positivo, porém não houve toxicidade no ensaio de hemólise. Outros ensaios de toxicidade, especialmente *in vivo* devem ser realizados para avaliar a real toxicidade deste alimento.
- Não foi observado resultado significativo na avaliação da inibição da atividade da enzima tirosinase pelo extrato bruto. Conclui-se que o extrato bruto não é interessante para a investigação quanto à utilização como produto despigmentante.

Este conjunto de resultados demonstra a necessidade de investigações futuras em relação à toxicidade e de novas atividades biológicas pelo potencial antioxidante e alelopático apresentado. Além do isolamento e identificação de substâncias que justifiquem tais atividades e, também investigações nutricionais que justifiquem o benefício do consumo do broto de girassol.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

ALVES, P. C. Z. **Estudos dos polimorfismos genéticos de enzimas antioxidantes associados à suscetibilidade aos danos no DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

ANDRADE, G. R. *et al.* Atividade enzimática de *Saccharum officinarum* L. em diferentes estágios da micropropagação em sistema de imersão temporária. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, Recife, 2010. **Anais...**

ANDRIOLI, W. J. **Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

ANJOS, A. L.; SOUZA, R. D.; ROSSATO, L. S. Desafios na medição quantitativa da ingestão alimentar em estudos populacionais. **Revista de Nutrição**, v. 22, p.151-161, 2009.

ARBOS, K. A. **Estudo do Potencial Antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos**. 2004. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: A.O.A.C.,1995.

BAGCHI, D. Preface. **Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United States and Around the World**, p. ix-xii, 2008.

BARBOSA, L. A. C. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: UFV, 2007.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. v.3

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae**. 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BLIGH, G. E.; DYER, J. W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p. 911-917, 1959.

BONTEMPO, M. **Por que usar suplementos e produtos naturais**. In: SUPLEMENTOS nutricionais e Produtos naturais. São Paulo: Editora Best Seller, 1997. p.33-34.

BORELLA, J. *et al.* Efeito alelopático de extratos aquosos de *Persea americana* Mill. sobre *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v.7, n.3, p.260-265, 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUBNIAK, L. T. **Nutracêuticos e alimentos funcionais para a obesidade**. 2004. 27f. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CAMPOS, A. D. *et al.* Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CASTRO, C. de.; FARIAS, J. R. B. Ecofisiologia vegetal. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHNTI, A. M.; CASTRO, C. de. (Ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.163-164.

CAYON, D.G. *et al.* Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, p.33-40, 1990.

CONFORTI, F. *et al.* Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium*, Turra aerial part. **Fitoterapia**, v.73, p.479-483, 2002.

COSTA, C. K. **Estudo Fitoquímico e *Bixa orellana* L., Bixaceae e aplicação de seu Óleo em Formulação Cosmética**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.

CRONQUIST. **Sistemática de Angiospermas do Brasil, Classificação Segundo Cronquist**, v.2, 1988.

DALL'AGNOL, A.; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C. Origem e história do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHNTI, A. M.; CASTRO, C. de. (ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.163-164.

DIAS, J. F. G. **Estudo Alelopático aplicado de *Aster lenceolatus*, Willd.** 2005. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.

DÍAZ-VICIEDO, R. D. *et al.* Modulation of inflammatory responses by diterpene acids from *Helianthus annuus* L. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.369, p.761-766, 2008.

DIETZ, H.; WINTERHALTER, P. Phytotoxic constituents from *Bunias orientalis* leaves. **Phytochemistry**, v.42, n.4, p.1005-1010, 1996.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p.351-359, 1999.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, p.350-356, 1956.

ESPÍN, C. E.; GARCIA-CONESA T. M.; TOMÁS-BARBERÁN, A. F. Nutraceuticals: Facts and fiction. **Phytochemistry**, Murcia, v.68, p.2956-3008, out. 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FERREIRA, D. F. **Sistema de análise de variância de dados balanceados (SISVAR)**: pacote computacional. Lavras: UFLA, 2000.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.291-296, 2005.

FORTES, R. C. *et al.* Hábitos Dietéticos de Pacientes com Câncer Colorretal em Fase Pós-operatória. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n.3, p. 277-289, 2007.

GIADA, M. D. L. R.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 25 jul. 2008.

GRAY, T. M.; ARNOYS, E. J.; BLANKESPOOR, S. Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91 to proline. **Protein Science**, v.5, p.742-751, 1996.

GUPTA, A. S. *et al.* Overexpression of Superoxide Dismutase Protects Plants from Oxidative Stress. **Plant Physiology**, v.103, p.1067-1073, 1993.

HANNINEN, O.; SEM, K. C. Nutritional Supplements and Functional Foods: Functional Significance and Global Regulations. **Nutraceutical and food Regulations**, Columbus, p.11-35, 2008.

HURTADO, F. C. *et al.* Coumarins in *Helianthus tuberosus*: Characterization, Induced Accumulation and Biosynthesis. **Phytochemistry**, v.38, n.3, p.1029-1036, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4.ed. São Paulo, 2008. cap. 4

JACOBSEN, J. V.; HANSON, A. D.; CHANDLER, P. C. Water stress enhances expression of an alpha-amylase gene in barley leaves. **Plant Physiology**, v.80, p.350, 1986.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7.ed. São Paulo: Ed Nacional, 1985.

KALEGARI, M. **Composição Fitoquímica e Atividades Biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae**. 2009. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.

KUPIDLOWSKA, E. *et al.* Impact of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Extracts Upon Reserve Mobilization and Energy Metabolism in Germinating Mustard (*Sinapis alba* L.) Seeds. **Journal of Chemical Ecology**. v.32, n. 12, p. 2569-2583, 2006.

LEITE, J. J. G. *et al.* Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.110-113, 2009.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.20, p.297-301, 1992.

LIMA, G. A. L. V. *et al.* Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.). **Revista de Nutrição**, v.17, n.1, p.53-57, 2004.

LIU, C. L. *et al.* Antioxidant Activity of Tartary (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.) and Common (*Fagopyrum esculentum* Moench) Buckwheat Sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, p.173–178, 2008.

LOURES, P. T. N. *et al.* Análise físico-química, microbiológica e sensorial de brotos de lentilha da variedade PRECOZ. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.31, n.4, p.599-606, 2009.

MACHADO, L. L. M. *et al.* Avaliação de componentes químicos em brotos de Fabaceae para consumo humano. **Ciência e agrotecnologia**, v.33, n.4, p.1071-1078, 2009.

MACÍAS, F. A. *et al.* A novel dimeric bioactive sesquiterpene lactone. **Tetrahedron Letters**, Espanha, v.45, p.6567-6570, jul. 2004.

MACÍAS, F. A. *et al.* Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p.683-687, 1997.

MACÍAS, F. A. *et al.* Bioactive terpenoids from sunflower leaves cv. Peredovick. **Phytochemistry**, Espanha, v.61, p.687-692, ago. 2002.

MACÍAS, F. A. *et al.* Helikauranoside A, a New Bioactive Diterpene. **Journal of Chemical Ecology**, Espanha, v.34, p.65-69, 2008.

MACÍAS, F. A. *et al.* Potencial allelopathic sesquiterpene lactones from sunflower leaves. **Phytochemistry**, v.43, n.6, p.1205-1215, 1996.

MACÍAS, F. A. *et al.* Potential Allelopathic Activity of Natural Plant Heliannanes: A Proposal of Absolute Configuration and Nomenclature. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, n.9, p.2173-2186, 2000.

MACÍAS, F. A. *et al.* Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals. **Journal of Natural Products**, Espanha, v. 69, p. 795-800, 2006.

MACRINI, D. J. *et al.* Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, n.2, p. 715-721, 2009.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.503-523.

MANDARINO, G. M. J. **Derivados protéicos do girassol**. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO GIRASSOL, 12., Campinas, 1997. Campinas, p.8–10, 1997.

MANO, A.R.O. **Efeito alelopático do extrato aquoso de sementes de cumaru (*Amburana cearensis* S.) sobre a germinação de sementes, desenvolvimento e crescimento de plântulas de alface, picão-preto e carrapicho**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal do Ceará.

MARQUES, A.C. **Propriedades funcionais da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) em diferentes condições de preparo e de uso em alimentos**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Maria

MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J. Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochemistry**, v.30, p.1431-1433, 1991.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fattyacids: importance and occurrence in foods. **Revista Nutrição**. v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MENDIETA, J. R.; GIUDICI, A. M.; CANAL, L. de la. Occurrence of Antimicrobial Serin-Proteinases in Sunflower Seeds. **Journal of Phytopathology**, v.43, p.147-152, 2004.

MEYER, B. N. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.45, p.31, 1982.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Disponível em: <www.mobot.org>. Acesso em: 20 jun. 2009.

MIYAZAWA, M. *et al.* Tyrosinase Inhibitor from Black Rice Bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.6953-6956, 2003.

MOON, K. J. *et al.* Analysis and Anti-Helicobacter Activity of Sulforaphane and Related Compounds Present in Broccoli (*Brassica oleracea* L.) Sprouts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.6672–6677, 2010.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

MORENO, M. I. N. *et al.* Comparison of the free radical-scavenging activity of própolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.109-114, 2000.

NADEEM, M. *et al.* Chemical characteristics and antioxidant activity of different sunflower hybrids and their utilization in bread. **African Journal of Food Science**, v.4, n.10, p.618-626, 2010.

ODÉN, P. C.; KARLSSON, G.; EINARSSON, R. Demonstration of superoxide dismutase enzymes in extracts of pollen and anther of *Zea mays* and in two related products, Baxtin and Polbax. **Grana**, v.3, p.76-80, 1992.

OHNO, S. *et al.* A species-selective allelopathic substance from germinating sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. **Phytochemistry**, v.56, p.577, 2001.

OLIVEIRA, M. F.; CASTIGLIONI, V. B. R.; CARVALHO, C. G. P. Melhoramento do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHNTI, A. M.; CASTRO, C. de. (ed.). **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p.163-164.

PELEGRINI, B. **Girassol uma planta solar que das Américas conquistou o mundo**. São Paulo: Icone Editora LTDA, 1985.

PEREIRA, N.P. **Estudo Fitoquímico do óleo da semente de [*Camomilla Recutita* (L.) Rauschert] camomila, com avaliação de propriedades físico-químicas, biológicas e funcionais em emulsões**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.

PINHEIRO, O. R. A.; TORRES, F. S.; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, v.17, p.523-533, 2004.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

PUTTER, J. Peroxidase. In: BERGMAYER, H. U. (ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Weinhan: Verlag Chemie, p.685-690, 1974.

QUILES, J. L. *et al.* Dietary Fat (Virgin Olive Oil or Sunflower Oil) and Physical Training Interactions on Blood Lipids in the Rat. **Nutrition**, v.19, p.363–368, 2003.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2.ed. New York: Academic Press, 1984.

RODRIGUES, H.G. *et al.* Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, v.16, n.3, p. 315-320, 2003.

ROSSI, O. R. **Girassol**. Curitiba: Editora Tecnoagro Ltda, 1997.

SÁNCHEZ, E. *et al.* Phenolic compounds and oxidative metabolism in green bean plants under nitrogen toxicity. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 27, p. 973-978, 2000.

SANTOS, I.; DUARTE, C. E. Fatores de risco e proteção para doenças crônicas não transmissíveis na população adulta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v.43, p.5-6, 2009.

SASAKI, C. M. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas e antimicrobianas das partes aéreas de *Pterocaulon lorentzii* Malme (Asteraceae)**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná.

SECHI, L. A. *et al.* Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). **Journal of Applied Microbiology** Itália, v. 90, p.279-284, 2001.

SEIGLER, D.S. Chemistry and mechanisms of allelopathy interactions. **Agronomy Journal**. v.88, n.6, p.876-885, 1996.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v.113, p.1202–1205, 2009.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SONG, F.M., ZHENG, Z.; CHUN, G.X.. Role of active oxygen and membrane lipid peroxidation in plant pathogen interactions. **Plant Physiology Communications**. v.32, n.5, p. 377-385, 1996.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v.42, p.1423-1426, 1967.

TIMME, R. E.; SIMPSON, B. B.; LINDER, C. R. High-resolution phylogeny for *Helianthus* (asteraceae) using the 18s-26s ribosomal DNA external transcribed spacer. **American Journal of Botany**. v.94, p.1837–1852, 2007.

URDANGARÍN, C. *et al.* Sunflower Coumarin Phytoalexins Inhibit the Growth of the Virulent Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Phytopathology**, v.147, p.441-443, 1999.

USDA. **National Nutrient Database for Standard Reference**. Release 23 (2010). Disponível em: http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl. Acesso em: 29 jan. 2010.

VEDANA, M. I. **Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná.

VIECELLI, C. A. *et al.* Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathology**, v.36, n.1, p.73-80, 2010.

VIRADOR, V. M. *et al.* A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v.270, p.207–219, 1999.

WEIR, T.L., PARK, S.W.; VIVANCO, J.M. Biochemical and hysiological mechanisms mediated by allelochemicals. **Current Opinion in Plant Biology**. v.7, p. 472–479, 2004.

WEISZ, G. M.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MS. **Food Chemistry**, v.115, p.758-765, 2009.

WILLS, R. B. H. *et al.* Nutrient Composition of Chinese Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 32, n. 2, p. 413-416, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and prevention of chronic disease. **World Health Org Tech Rep Ser**, n.916, 2003.

YANAKA, A. *et al.* Dietary Sulforaphane-Rich Broccoli Sprouts Reduce Colonization and Attenuate Gastritis in *Helicobacter pylori*–Infected Mice and Humans. **Cancer Prevention Research**, v.1158, p.1940-6207, 2009.